Aus der Med. Klinik und Poliklinik - Klinik A - der
Universität Düsseldorf
(Direktor: Prof.Dr.med.W.Schneider)

Untersuchungen zur renalen und extrakorporalen Elimination von Digoxin und seinen methylierten und acetylierten Derivaten beim Menschen und Hund.

Habilitationsschrift

Der Hohen Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf
zur Erlangung der venia legendi für das Fach Innere Medizin

vorgelegt von

Teut Risler 1980

1981

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536504_0004

Aus der Med. Klinik und Poliklinik - Klinik A - der
Universität Düsseldorf
(Direktor: Prof.Dr.med.W.Schneider)

Untersuchungen zur renalen und extrakorporalen Elimination von Digoxin und seinen methylierten und acetylierten Derivaten beim Menschen und Hund.

Habilitationsschrift

Der Hohen Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf
zur Erlangung der venia legendi für das Fach Innere Medizin

vorgelegt von

Teut Risler 1980

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Untersuchungen zur renalen und extrakorporalen Elimination von Digoxin und seinen methylierten und acetylierten Derivaten beim Menschen und Hund.

Inhaltsverzeichnis.

		Seite
1.	Einleitung und Fragestellung	1
2.	Methodik	4
2.1.	Bestimmung des Digoxins im Serum und Urin	4
2.1.1.	Prinzip des Radioimmunoassays	4
2.1.2.	Herstellung von Digoxin-spezifischen Antikörpern	5
2.1.3.	Aufbau eines Radioimmunoassays für Digoxin	6
2.2.	Messung der Eiweißbindung bei nierengesunden und niereninsuffizienten Patienten und nierengesunden Hunden	10
2.3.	Bestimmung des Chinidins im Serum	11
2.4.	Doppelisotopenzählverfahren	11
2.5.	Klinische Laboruntersuchungen	12
2.6.	Rechenvorgänge	14
2.7.	Diskussion der Methodik	15
3.	Die Bedeutung unterschiedlicher Methoden zur Messung der renalen Digoxin-Clearance	21
3.1.	Versuchsanordnung	22
3.2.	Ergebnisse	26
3.3.	Diskussion	29
4.	Der renale Ausscheidungsmechanismus Digoxins und seiner Derivate beim Menschen und Hund	34
4.1.	Versuchsanordnung	35
4.2.	Ergebnisse	36
4.3.	Diskussion	37
5.	Der renale Exkretionsmechanismus von Digoxin bei akuter Niereninsuffizienz	39
5.1.	Versuchsanordnung	40
5.2.	Ergebnisse	42
5.3.	Diskussion	44

Inhaltsverzeichnis:

		Seite
6.	Interaktion von Digoxin und anderen Arzneimitteln bei der renalen Elimination	46
6.1.	Versuchsanordnung	47
6.2.	Ergebnisse	48
6.3.	Diskussion	49
7.	Die extrakorporale Elimination von Digoxin	52
7.1.	Versuchsanordnung	53
7.2.	Ergebnisse	57
7.3.	Diskussion	59
8.	Zusammenfassung	63
9.	Literaturverzeichnis	

1. Einleitung und Fragestellung.

Digoxin wird wie auch seine methylierten und acetylierten Derivate zu 60 - 80% über die Nieren ausgeschieden (Doherty et al. 1962, Bloom et al. 1966, Huffmann et al. 1972, Dengler et al. 1973, Greenblatt et al. 1973, Johnson et al. 1975, Huffmann et al. 1976, Rietbrock et al. 1977). Bereits nach einem Tag sind 30 - 50% einer per oral verabreichten Dosis im Urin nachweisbar (Falch 1973, Gilfrich et al. 1975, Greenwood et al. 1975, Ochs et al. 1975, Johnson et al. 1976). Etwa 10 - 30% in Einzelfällen bis 50% des renal eliminierten Glykosides ist metabolisch umgewandelt (Doherty et al. 1961, 1962, 1970, Marcus et al. 1964, 1966, Luchi et al. 1968, Clark et al. 1974, Rietbrock et al. 1975, Gault et al. 1976).

Diese Abhängigkeit des Digoxinstoffwechsels von der renalen Ausscheidung hat mehrere Arbeitsgruppen dazu veranlaßt, den renalen Exkretionsmechanismus genau zu untersuchen. Seit Bloom et al. 1966 erstmals Ergebnisse renaler Digoxin-Clearances mitgeteilt haben, wurden sehr unterschiedliche Ergebnisse der verschiedenen Arbeitsgruppen veröffentlicht. Bloom et al. 1966, Ewy et al. 1969, Doherty et al. 1972, Jusko et al. 1974 sowie van der Vijgh et al. 1977 konnten zeigen, daß Digoxin fast ausschließlich glomerulär filtriert wird. Die dabei verwandten Untersuchungsmethoden unterschieden sich erheblich und ihre Ergebnisse sind nur bedingt vergleichbar. Die Patienten waren entweder akut oder auch chronisch digitalisiert. Bloom et al. 1966, Ewy et al. 1969 sowie Doherty et al. 1972 verwendeten unspezifisch Tritium-markiertes Digoxin zur Messung der Clearances, während Jusko et al. 1974 und van der Vijgh et al. 1977 Digoxinserum und Urinkonzentrationen radioimmunologisch ermittelten und an Hand dieser Resultate die Clearanceberechnungen durchführten. Ewy et al. 1969, Doherty et al. 1969 beim Hund sowie Roman et al. 1976 bei der Ratte konnten im Akutversuch eine zusätzliche tubuläre Absorption nachweisen. Auch sie verwendeten Tritium-markiertes Digoxin für ihre Versuche. Gegensätzliche Ergebnisse, die ausweisen, daß Digoxin glomerulär

filtriert und zusätzlich tubulär sezerniert wird, veröffentlichten Koup et al. 1975 (akut digitalisierte Patienten) und Falch et al. 1973, Iisalo et al. 1974, Steiness 1974 sowie auch wir, Risler et al. 1974 (chronisch digitalisierte Patienten).

Für den Kliniker wird die Therapie mit Digoxin und seinen Derivaten noch zusätzlich kompliziert durch extrarenale Einflüsse auf den Eliminationsweg über die Nieren. Steiness 1974 konnte eine Interaktion von Digoxin und Spironolactone, Hooymanns et al. 1978, Doering 1979, ebenso wie wir (Risler et al. 1979) eine solche mit Chinidin bei der renalen Elimination nachweisen. Aber auch eine Über- oder Unterfunktion der Schilddrüse (Doherty et al. 1966, Croxson et al. 1975, Shenfield et al. 1977, Ruiz-Torres 1977, Bonelli et al. 1978) und Elektrolytverschiebungen, die mit einer Hypokaliämie einhergehen (Steiness et al. 1978), nehmen Einfluß auf die renale Ausscheidung des Digoxins.

Da die therapeutische Breite der Digitalisglykoside sehr gering bemessen ist, erscheint es nicht überraschend, daß mehrere Autoren (Beller et al. 1971, Smith 1975, Risler et al. 1975, Haasis et al. 1975) in Untersuchungen der Ursachen für klinisch, elektrokardiographisch und radioimmunologisch gesicherte Digoxin-Intoxikationen eine ungenügende Anpassung der Dosierung des Digoxins an die individuelle Nierenfunktion als Hauptgrund nachweisen konnten.

Neben der renalen Elimination von Digoxin ist die extrakorporale durch heute routinemäßig verwandte Peritoneal- und Hämodialyse oder die Hämofiltration in zweifacher Hinsicht von Interesse. Patienten, die unter einer terminalen Niereninsuffizienz leiden und die häufig einer Digitalistherapie bedürfen, müssen sich 2- bis 3-mal pro Woche dieser Behandlung unterziehen. Nach Arbeiten von Bloom et al. 1966, Ackermann et al. 1967 sowie Kramer

et al. 1972 ist die extrakorporale Elimination von Digoxin so gering, daß eine Digoxintherapie unbeeinflußt bleibt.

Sehr unterschiedlich wird die Indikation der Hämodialyse, Hämofiltration und Hämoperfusion zur Behandlung der Digoxin-Intoxikation beurteilt. Während Kramer 1977 die Hämodialyse zur Behandlung der Digoxin-Intoxikation empfahl, hielten Holt et al. 1975 sowie Haasis et al. 1975 diese Indikation für die Hämodialyse für ungeeignet. Obwohl die Hämoperfusion in der Lage ist, wesentlich effektiver als die Hämodialyse, Digoxin aus dem Blut zu eliminieren, ist auch diese Methode zur Behandlung der schweren Digoxin-Intoxikation umstritten (Carvallo et al. 1976, Gibson et al. 1978, Risler et al. 1979).

Die Aufgabe dieser Arbeit soll es sein, die Probleme der renalen und extrakorporalen Elimination von Digoxin näher zu untersuchen und dabei folgende Fragen zu beantworten:

Die Bedeutung unterschiedlicher Methoden zur Messung der renalen Digoxin-Clearance: Ein Vergleich (Kapitel 3).
Der renale Ausscheidungsmechanismus des Digoxins und seiner Derivate (Kapitel 4).
Der renale Exkretionsmechanismus bei akuter Niereninsuffizienz (Kapitel 5).
Die Interaktion von Digoxin und anderen Arzneimitteln bei der renalen Elimination (Kapitel 6).
Die extrakorporale Elimination von Digoxin (Kapitel 7).

2. Methodik.

2.1. Bestimmung des Digoxins im Serum und Urin.

2.1.1. Das Prinzip des Radioimmunoassays.

Das Radioimmunoassay wurde von Yarlow und Berson 1960 für die Analyse der Serumkonzentration von Polypeptiden entwickelt. Smith, Butler und Haber modifizierten diese Methode 1969 für die Bestimmung von Digoxin.

Das Prinzip des Radioimmunoassays beruht auf der kompetitiven Bindung von zwei gleichartigen Antigenen, von denen eines radioaktiv markiert ist, an einen Antikörper. Assoziation und Dissoziation von Antigen und Antikörper unterliegen dem Massenwirkungsgesetz. Die Geschwindigkeit der Bindung vom Antigen an den Antikörper wird bestimmt durch die Affinität des Antigens zum Antikörper.

Das Assay wird durchgeführt, indem das zu analysierende Serum bzw. der Urin in einem Puffer einer definierten Menge ^{3}H- oder ^{125}J-markiertem Digoxin sowie einer bestimmten Menge Digoxin-spezifischem Antikörper zugesetzt wird. Während einer Inkubationszeit treten markiertes und unmarkiertes Digoxin in Konkurrenz um die Bindungsstellen am Antikörper. Nach Erreichen eines Gleichgewichtes wird an Antikörper gebundenes und freies Digoxin getrennt. Zur Trennung hat sich dextranbeschichtete Holzkohle bewährt. Sie ist in der Lage, annähernd 100% des freien Digoxins zu binden. Nach Abzentrifugation der Holzkohle wird die Radioaktivität im Überstand gemessen und mit einer Eichkurve, die unter gleichen Bedingungen aber mit definierten Mengen an unmarkiertem Digoxin angesetzt wird, verglichen.

2.1.2. Herstellung von Digoxin-spezifischen Antikörpern.

Digoxin ist als Hapten nicht in der Lage, eine Antikörperbildung im Organismus anzuregen. Es ist deshalb notwendig, das Glykosid an Eiweiß zu binden.

Wir wählten die Methode von Erlanger und Beiser 1974, gering abgewandelt nach den Angaben von Butler und Chen 1967.

Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Oxidation des letzten Digitoxosemoleküls durch Natriumperjodat. Nach Anheben des pH auf 9 - 9,5 und Beseitigung des Natriumperjodat durch Äthylenglykol wird das Digoxinreaktionsprodukt an die endständige Aminosäure (Lysin) gebunden. Zur Stabilisierung der Bindung ist eine Reduktion mit Natriumborhydrid notwendig.

Immunisierung von Kaninchen.

6 männliche Kaninchen (weiße Neuseeland-Kaninchen, Gewicht 3 kg) wurden entsprechend den Angaben von Smith et al. 1969 mit dem Rinderserumalbumin Digoxinkonjugat immunisiert.

Die Blutentnahmen zur Antikörper-Titerbestimmung erfolgten nach 2, 4, 6 und 8 Monaten.

Die Konzentration der Digoxin-spezifischen Antikörper im Serum der Kaninchen wurde mittels einer Verdünnungsreihe überprüft. Als Antikörpertiter wurde diejenige Serumkonzentration bestimmt, bei der 1,5 ng eines ^{3}H-markierten Digoxins zu 50% an Antikörper gebunden wurden. Bei einem Kaninchen wurde ein Antikörpertiter von 1:22.000 erreicht. Da die Antikörper im Hinblick auf ihre Spezifität allen Anforderungen entsprachen, wurde dieses Kaninchen entblutet und das Serum bei -20°C eingefroren.

Prüfung der Spezifität der Digoxin-Antikörper.

Untersucht wurde die relative Bindungsaffinität (in Prozent), die dem Quotienten aus der Menge an unmarkiertem Digoxin zu der Menge der zu prüfenden Substanz entspricht, die erforderlich ist, um 50% des radioaktiv markierten Digoxins aus der Antikörperbindung zu verdrängen. Der Antikörper zeigte ein

identisches Bindungsvermögen für Digoxin und ß-Methyldigoxin. Digoxigenin, Digoxigenin-mono- und Digoxigenbis-digitoxosid werden etwa gleich wie Digoxin vom Antikörper gebunden. Wesentlich höhere molare Konzentrationen des Digitoxin und Digitoxigenin sind nötig, um Digoxin vom Antikörper zu verdrängen (Abb. 1). Alle anderen Substanzen (Progesteron, Testosteron, Aldosteron, Cortisol, Spironolactone, Cholesterin, Chinidin) haben auch im 100-fachen molaren Überschuß keine Wirkung auf die Antikörperbindung des Digoxins. Eine Übersicht gibt die Tabelle 1.

2.1.3. Aufbau eines Radioimmunoassays für Digoxin.

Herstellung des Phosphatpuffers, der Digoxin-Standardlösung, der ^{3}H-Digoxin-Stammlösung, der Digoxin-Antikörperverdünnung und der Dextran-Holzkohle.

Zur Herstellung des Phosphatpuffers (0,15 m NaCl, 0,01 m Na_2HPO_4, pH 7,4) werden 8,7 g NaCl und 1,42 g Na_2HPO_4 in 900 ml H_2O Bidest gelöst. Der pH wird mit 0,1 N NaOH-Lösung auf 7,4 eingestellt. Das Volumen wird mit H_2O auf 1000 ml gebracht. Bei 4°C ist der Phosphatpuffer bis 6 Monate haltbar.

Digoxin-Standardlösung.

10 mg Digoxin, das dünnschichtchromatographisch rein ist (Fa. Boehringer, Mannheim), wird in 10 ml absolutem Alkohol gelöst. Die Standardlösungen werden mit absolutem Alkohol so weiter verdünnt, daß in 10/ul 0,25, 0,5, 0,75, 1,0 und 2,5 ng Digoxin enthalten sind.

^{3}H-Digoxin-Stammlösung.

Spezifisch 12 α -^{3}H-markiertes Digoxin (spezifische Aktivität 14 mCi/mg NEN Boston) wird in absolutem Alkohol bis zu einer Konzentration von 1,5 ng/50/ul verdünnt. Die Reinheit des Tritium-markierten Digoxins betrug nach dünnschichtchromatographischer Kontrolle 98%. Die ^{3}H-Digoxin-Stammlösung ist bei 4°C ein Jahr lang haltbar.

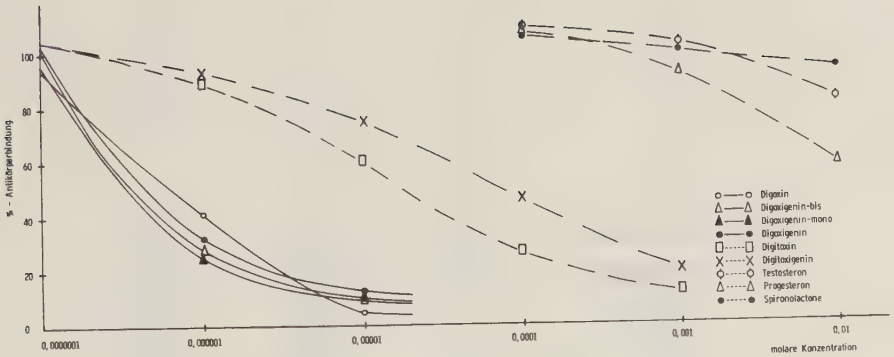

Abb. 1: Die molaren Konzentrationen von Digoxin, Digoxigen-bis-digitoxosid, Digoxigenin-mono-digitoxosid, Digoxigenin, Digitoxin, Digitoxigenin, Testosteron, Progesteron und Spironolactone, die ^{3}H-Digoxin (1,92 pmol = 1,5 ng) aus der Antikörperbindung verdrängen können.

Substanz	Molekular Gewicht	pmol Substanz	Rel. Bindungs-affinität (%)
DG 3	780,9	7,8	100
DG 2	650,8	14,3	55,5
DG 1	520,6	6,5	125
DG 0	390,5	7,0	111,5
DT 3	764,9	209,2	3,7
DT 0	374,5	2059,9	0,38
Testosteron	288,4	>1000	<0,01
Progesteron	314,5	>1000	<0,01
Aldosteron	219,5	>1000	<0,01
Spironolactone	416,6	>1000	<0,01
Cortisol	362,5	>1000	<0,01
Cholesterin	386,7	>1000	<0,01
Chinidin	324,4	>1000	<0,01

Tab. 1: Die relative Bindungsaffinität des Digoxin-Antikörpers, die den Quotienten aus der Menge an unmarkiertem Digoxin zu der Menge zu prüfender Substanz entspricht, die erforderlich ist, um 50% ($\frac{max}{2}$) des ^{3}H-Digoxins aus der Antikörperbindung zu verdrängen.

Digoxin-Antikörperlösung.

Das unverdünnte Kaninchenserum wurde in Einzelportionen zu 0,1 ml bei - 20°C eingefroren. Vor Gebrauch wird es aufgetaut und mit Phosphatpuffer 1:1000 verdünnt. Diese Antiserumverdünnung wird im Ansatz nochmals 22-fach verdünnt, so daß eine Endverdünnung von 1:22.000 resultiert.

Herstellung der dextranbeschichteten Holzkohle.

14,7 g Natriumbarbital werden in 500 ml H_2O mit 9,7 g Natriumacetat vermischt (Lösung 1). 8,5 g Natriumchlorid werden in 1000 ml H_2O gelöst (Lösung 2).
5 ml 0,1 N HCl werden in 600 ml H_2O gelöst (Lösung 3).

Von diesen drei Lösungen werden 100 ml (Lösung 1) 1800 ml (Lösung 2) 100 ml (Lösung 3) vermischt und auf ein pH von 7,4 mit 1 N NaOH bzw. 1 N HCl gebracht. Zu dieser Lösung werden 2,5 g Dextran T70 (Pharmacia, Upsala, Schweden) und 100 g Holzkohle (Norit A Neutral) zugegeben, über Nacht bei 4°C auf einem Magnetrührer vermischt. Die Gebrauchslösung ist bei 4°C für 3 Monate haltbar.

Digoxin-Radioimmunoassay.

In der Tabelle 2 sind die einzelnen Pipettierschritte des Radioimmunoassays aufgeführt. Nach Zugabe des Antikörpers wird der Assayansatz 1 Stunde lang bei Raumtemperatur inkubiert.
Nach Zugabe von jeweils 0,5 ml eisgekühlter Dextran-Holzkohlelösung und einer zweiten Inkubationszeit von 5 Minuten werden die Röhrchen in einer Kühlzentrifuge bei 4°C und 2000 g für 20 Minuten zentrifugiert.

Die Messung der ^3H-Aktivität wurde in einem Flüssigkeitsszintillationszähler (Packard Modell 3380) mit einem automatischen externen Standard durchgeführt.

Eichkurve zur Analyse der Serum-Digoxinkonzentration.

Für jeden Radioimmunoassay-Ansatz wurde eine Eichkurve an Hand der Digoxin-Standardverdünnung von 0,5 - 5 ng/ml erstellt.

Ansatz zur Bestimmung von Digoxin im Serum

Röhrchen	PBS-Puffer	humanes-Serum	Standard	^{3}H Digoxin	Antikörper	Dextran Kohle	Patienten-serum	
1-3	1,1	0,5	-	-	-	-	-	Leerwert
4-6	0,5	0,5	-	0,05	-	0,5	-	unsp. Bindung
7-9	1,05	0,5	-	0,05	-	-	-	Gesamtakt.
10-12	0,5	0,5	-	0,05	0,05	0,5	-	Max. Bindung
13-30	0,5	0,5	0,01	0,05	0,05	0,5	-	Standard
31-33	0,5	-	-	0,05	0,05	0,5	0,5	Probe

Tab. 2: Tabellarische Aufstellung der Pipettierschritte des Radioimmunoassays. Standard (Röhrchen 13 - 30) umfaßt die Digoxinkonzentration 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 3,0 und 5,0 ng/ml.

Durch Bildung des Quotienten C_o zu C_x wurde die hyperbolische Kurve in eine Gerade umgewandelt.
C_o = Antikörper-gebundenes ^{3}H-Digoxin in Abwesenheit von unmarkiertem Digoxin.
C_x = Antikörper-gebundenes ^{3}H-Digoxin in Anwesenheit von verschiedenen Konzentrationen des markierten Digoxins.

Abbildung 2 zeigt die mittlere Eichkurve, errechnet aus 20 Bestimmungen. Die zugehörige Funktion lautet:

$Y = 0{,}3788\ X + 1{,}0294$

Der mittlere Korrelationskoeffizient wurde für diese Eichkurven mit $r = 0{,}9994 \pm 0{,}0005$ berechnet.

Die Steigung der Geraden betrug im Mittel: $0{,}3788 \pm 0{,}006$. Der Schnittpunkt mit der Y-Achse (theoretisch bei 1) wurde im Mittel mit: $1{,}0294 \pm 0{,}0173$ errechnet.

Quenchkurve.

Die Quench-Korrektur der im Szintillationszähler gemessenen CPM in DPM wurde an Hand einer Kurve ermittelt, die erstellt wurde, indem 100.000 DP M (^{3}H-Toluol NEN Boston) in eine Verdünnungsreihe aus hämolytischem Serum und Phosphatpuffer pipettiert wurden und die Wiederfindungsrate für die einzelnen Quenchwerte errechnet wurde.
Die so errechnete Kurve lautete:

$$Y = 81{,}2483\ X - 17{,}8479 \quad (r = 0{,}9901)$$

Berechnung der Serum-Digoxinkonzentrationen.

Die Serum-Digoxinkonzentrationen wurden an Hand der transformierten Geraden mit einem Tischrechner (Olivetti 101) ermittelt.

Empfindlichkeit des Assays.

Jeweils 10 Serumproben, die eine Konzentration von 0,0, 0,1, 0,2, 0,3,0,4, 0,5 ng/ml enthielten, wurden untersucht. Es war möglich, 0,2 ng/ml signifikant von 0 ng/ml zu unterscheiden ($p < 0{,}02$).

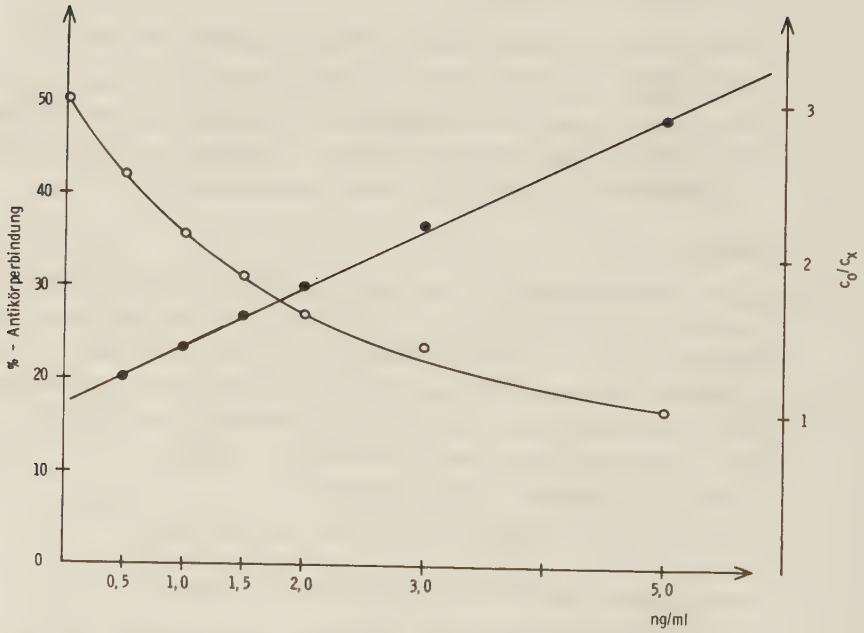

Abb. 2: Eichkurve des Radioimmunoassays (Summe aus 20 Bestimmungen) und die aus den Quotienten C_o/C_x gebildete Regressionsgerade

C_o = Antikörper-gebundes ^{3}H-Digoxin in Abwesenheit von unmarkiertem Digoxin.

C_x = Antikörper-gebundes ^{3}H-Digoxin in Anwesenheit von verschiedenen Konzentrationen an unmarkiertem Digoxin.

Qualitätskontrolle.

Alle Analysen (Eichkurve, Seren, Urin) wurden in Dreifachbestimmungen durchgeführt.

Neben den festgelegten Digoxinkonzentrationen der Eichkurve wurden zwei Poolseren bei jedem Radioimmunoassay-Ansatz mitbestimmt.

1,0 mg bzw. 2,4 mg Digoxin reinst (Fa. Boehringer, Mannheim) wurde abgewogen und in einem Liter Phosphatpuffer gelöst. 1 ml dieser Lösung wurde einem Liter menschlichen Serum zugegeben. Beide Seren (Konzentration 1,0 und 2,4 ng/ml) wurden als Dreifachbestimmungen in jedem Assay mituntersucht. Eine Abweichung von mehr als einer Standardabweichung vom Mittelwert führte dazu, daß das Assay verworfen wurde.

2.1.4. Radioimmunoassay für die Bestimmung der Serum-Digoxinkonzentration im Urin.

Die oben beschriebene Methode wurde auch für die Digoxinkonzentrationsmessung im Urin angewendet. Da die Digoxinkonzentration im Urin im allgemeinen höher ist, wurde unser Assay insofern verändert, als anstelle von Patientenserum 0,5 ml eines 1:100 in digoxinfreiem Serum verdünnten Urins in das Assay eingesetzt wurde. Falls die so erreichte Digoxinkonzentration außerhalb der Eichkurve gemessen wurde, wurde die Verdünnung des Urins geändert und die Probe erneut bestimmt.

2.2. Eiweißbindung von Digoxin bei nierengesunden und niereninsuffizienten Patienten und nierengesunden Hunden.

Zur Analyse der Eiweißbindung wurde die Methode von Scholten et al. 1966 und Benthe 1975 verwendet.

8 ml Serum wurden in vier gleiche Portionen aufgeteilt. 3 x 2 ml wurden in einer Ultrazentrifuge Typ MSE Automatic 40 T.C. für 16 Stunden bei 150.000 g (Temperatur 22°C) zentrifugiert. Es bildete sich eine Dreischichtung des Serums heraus. Die oberste Schicht enthielt die Serumlipide, die mittlere Schicht das eiweißfreie Serum, das Eiweiß bildete darunter einen Bodenansatz. Aus der mittleren Schicht wurden 0,8 ml abpipettiert und die Digoxinkonzentration radioimmunologisch wie oben angegeben gemessen, nachdem mit der Methode von Lowry et al. 1951 kein Eiweiß in dieser Flüssigkeit nachgewiesen werden konnte. Aus der Differenz zwischen der Digoxinserumkonzentration im unbehandelten Serum (4.Portion à 2 ml) und dem eiweißfreien Überstand wurde der eiweißgebundene Anteil errechnet.

Bei 10 Patienten, die wegen einer Herzinsuffizienz 0,4 mg ß-Acetyldigoxin (Novodigal) erhalten hatten, wurde eine normale Nierenfunktion ermittelt (Serumkreatinin 0,9 $\pm$ 0,3 mg%). Das Gesamteiweiß wurde innerhalb der Norm gemessen (6,2 $\pm$ 0,6 g%). Im Serum dieser Patienten waren 22 $\pm$ 4% des Digoxins an Eiweiß gebunden. Bei 10 Patienten, deren Nierenfunktion eingeschränkt war (Serumkreatinin 10,3 $\pm$ 4,3 mg%, Gesamteiweiß 5,9 $\pm$ 0,5 g%) und die ß-Acetyldigoxin in einer an die Nierenfunktion angepaßten Dosierung erhalten hatten, wurde eine signifikant niedrigere Digoxin-Eiweißbindung von 17 $\pm$ 4% gemessen ($p < 0,02$).

Bei 5 Hunden, die während 5 Tagen 0,03 mg/kg Körpergewicht Digoxin (Novodigal) intravenös erhalten hatten, wurde die Serumeiweißbindung mit 20 $\pm$ 5% nicht signifikant unterschiedlich von der beim Menschen gefunden.

2.3. Chinidinbestimmung im Serum.

Chinidin wurde nach der Doppelextraktionsmethode entsprechend den Angaben von Kessler et al. 1974 analysiert.

1. Herstellung der Chinidin-Stammlösung.

120,7 mg Chinidinsulfat wurden in 1 Liter 0,1 N H_2SO_4 gelöst (Konzentration 100 mg Chinidin/l).

2. Zur Herstellung einer Eichkurve wurde die Stammlösung bis zu Konzentrationen von 0,625 bis 10 µg/ml menschlichem Serum weiter verdünnt.

3. Assay-Methodik.
0,25 ml Standardlösung bzw. Patientenserum wurden in einem Zentrifugenröhrchen (Fassungsvermögen 10 ml) mit 0,25 ml 0,1 N NaOH und 2,5 ml 1-Chlorbutan vermischt und 5 Min. geschüttelt.
Nach 15 Min. wurden 1,5 ml des Überstandes in einem anderen Zentrifugenröhrchen mit 3,0 ml 0,1 N H_2SO_4 vermischt und 5 Min. geschüttelt.

4. Messung.
0,3 ml der wässrigen Phase (Unterstand) wurden in einem Spektrofluorometer (Perkin-Elmer 2040A) bei den Wellenlängen 350 nm (E) und 450 nm (A) gemessen.

Aus den gemessenen Extinktionen der Standardlösung wurde eine Eichkurve erstellt und die Chinidinkonzentration der Patientenseren entsprechend an Hand der Eichkurve abgelesen.

2.4. Doppelisotopenzählverfahren.

Die Seren und Urine, in denen ^{14}C-Inulin und ^{3}H-Digoxin enthalten waren, wurden nach der Doppelisotopenzählmethode mit doppeltem internem Standard ausgewertet (Kobayashi et al. 1974).

0,1 ml Serum bzw. Urin wurden in ein Isotopengefäß pipettiert. Dazu wurden 10 ml eines Szintillations-Cocktails (Bioflour, NEN Boston) gegeben. In einem Vorversuch stellte sich heraus, daß ^{14}C-Inulin in dieser Lösung nicht stabil war und langsam ausfiel, so daß die gemessene Radioaktivität scheinbar mit der Zeit abnahm. Wie von McEvoy et al. 1971 beschrieben, konnte durch Zugabe von 1 ml Aquabidest das ^{14}C-Inulin in der Lösung stabilisiert werden.

In einem Packard-Szintillationszähler Typ 3030 wurden die ^{3}H- und ^{14}C-Aktivität in zwei Kanälen getrennt (entsprechend dem Energiespektrum) gemessen. Durch Zugabe einer definierten Menge ^{14}C-Toluol (NEN Boston) wurde die Effektivität der ^{14}C-Messung und der Prozentsatz der im ^{3}H-Kanal mitgemessenen ^{14}C-Counts errechnet. Eine definierte Menge ^{3}H-Toluol wurde im Anschluß daran eingefüllt, um die Effektivität der ^{3}H-Messung zu errechnen. Im ^{14}C-Kanal wurde keine ^{3}H-Aktivität registriert. Aus den gemessenen Effektivitäten wurden die DPM für ^{14}C und ^{3}H errechnet.

2.5. Klinische Laboruntersuchungen.

Leukozyten, Erythrozyten, Hämatokrit und Hämoglobin wurden mit dem Coulter-Counter Modell S bestimmt.

Normwerte: Männer (Frauen):

Hämoglobin	14-18 (12-16)	g%
Leukozyten	4.800-10.800 (4.800-10.800)	mm^3
Erythrozyten	4,6-6,2 (4,2-5,4)	Mill./mm^3
Hämatokrit	42-52 (37-47)	%

Das Gesamteiweiß wurde mit der Biuret-Methode ermittelt.
Normbereich: 6,2 -8 g Protein/100 ml Serum.
Die einzelnen Eiweißfraktionen wurden mit der Zonenelektrophorese auf Zellulose-Acetatfolie getrennt.

Normwerte:	rel.%	Abs.Werte (g/100 ml Serum)
Albumin	56-66	3,8-5,0
alpha 1-Globulin	2,5-4,5	0,2-0,35
alpha 2-Globulin	6,5-10,0	0,5-0,75
beta-Globulin	8,5-14,0	0,6-1,0
gamma-Globulin	11,0-19,0	0,7-1,5

Zum Nachweis von Eiweißspuren im Ultrafiltrat wurde die Methode von Lowry et al. 1951 angewendet.

Die Harnstoff-N-Bestimmung wurde nach der Methode von Berthelot nach enzymatischer Hydrolyse und der Bestimmung des entstandenen Amoniaks durchgeführt.
Normwert: < 28 mg/100 ml Serum.

Das Kreatinin im Serum und Urin wurden nach der Methode von Jaffee bestimmt.
Normbereich im Serum: 0,8-1,3 mg/100 ml.

Die Elektrolyte Natrium, Kalium, Calcium wurden flammenphotometrisch analysiert, Chlorid potentiometrisch.

Normbereich:			
Natrium	135-150	mval/l	Serum
Kalium	3,6-5,2	"	"
Calcium	4,4-5,5	"	"
Chlor	98-110	"	"

Die Einzelheiten der aufgeführten Methode wurden entnommen aus W.Rick: Klinische Chemie und Mikroskopie, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 1974.

Die Blutgasanalyse wurde nach der Mikromethode von Astrup durchgeführt. Die Messung des Sauerstoffdruckes wurde polarographisch vorgenommen.
Normwerte im arteriellen Blut:

Sauerstoffspannung	70 mm Hg
Kohlensäurespannung	38-41 mm Hg
Wasserstoffionenkonzentration (pH)	7,38-7,41
Standardbicarbonat	24,0-26,0 mval

Das Glomerulusfiltrat und der effektive Nierenplasmastrom wurden nach der Methode von Smith et al. 1938 ermittelt. Als Parameter für das Glomerulusfiltrat diente Inulin, für die Nierendurchblutung Paraaminohippursäure. Inulin und PAH-Clearances wurden gleichzeitig nach der Methode mit gleichbleibenden Plasmaspiegeln bei initialer Anflutung und anschließender Dauerinfusion der Testsubstanzen durchgeführt. Nach 1 Stunde und Erreichen eines steady state wurden drei 20-minütige Urinsammelperioden ausgewertet. Inulin wurde nach den Angaben von Deutsch 1949, PAH nach der Methode von Smith et al. 1945 analysiert.
Normwerte (ml/min.):
Inulin-Clearance: 157 (1,16 x Alter in Jahren)
PAH-Clearance: 820,2- (6,75 x Alter in Jahren).

2.6. Rechenvorgänge.

Der statistischen Auswertung der Daten lagen die Einzelwerte, deren arithmetische Mittelwerte plus/minus Standardabweichung der Einzelwerte (S) zugrunde. Der Variationskoeffizenz (VK) errechnete sich als Standardabweichung der Einzelwerte in Prozent des Mittelwertes.

Zur Prüfung der Signifikanz wurde der verteilungsfreie Wilcoxon-Test für Pardifferenzen angewandt. Als signifikant galt eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% (p 0,05). Der Student T-Test wurde zum Vergleich der Ergebnisse zweier Grundgesamtheiten verwendet. Bei (N_1+N_2-2) Freiheitsgraden wurde aus den Mittelwerten $\bar{X}_1$ und $\bar{X}_2$ den Varianzen S_1^2 und S_2^2 von zwei unverbundenen Stichproben vom Umfang N_1 bzw. N_2 die Größe T nach folgender Gleichung berechnet:

$$T = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\frac{(N_1-1)\,S_1^2 + (N_2-1)\,S_2^2}{N_1+N_2-2} \times \frac{1}{N_1} + \frac{1}{N_2}}}$$

Die Null-Hypothese wurde verworfen, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner als 5% war. Die Signifikanzschranken für T wurden den wissenschaftlichen Tabellen (Documenta Geigy 1969) entnommen. Der Korrelationskoeffizienz (r) von n-Wertepaaren (X;Y) wurde nach der folgenden Gleichung berechnet:

$$r = \frac{\sum xy - N\bar{x} \cdot \bar{y}}{\sqrt{(\sum x^2 - N\bar{x}^2)\,(\sum y^2 - N\bar{y}^2)}}$$

2.7. Diskussion der Methodik.

Digoxin-Radioimmunoassay.

Die geringe therapeutische Breite der Digitalisglykoside und die große Anzahl von Faktoren, die eine Therapie mit Herzglykosiden beeinflussen können, bergen die Gefahr sowohl einer ungenügenden wie auch einer übermäßigen Digitalisierung in sich. Es ist deshalb verständlich, daß bereits am Anfang dieses Jahrhunderts Methoden zur Standardisierung der Digitalistherapie besonders zum Vergleich der verschiedenen Pflanzenextrakte erarbeitet wurden (Focke 1913, Gottlieb 1914, Straub 1915, Joachimoglou 1921). Bedeutung erlangte das Bioassay, das 1919 von Hatcher und Brody an der Katze zum Wirkungsvergleich verschiedener Herzglykoside entwickelt wurde.

Die klinische Anwendung der Herzglykoside stützte sich weitgehend auf die lange Erfahrung mit dieser Therapieform. Man kannte die therapeutischen und toxischen Symptome und richtete nach diesen die Dosierung der einzelnen Herzglykoside, ohne allerdings bereits die Pharmakokinetik der einzelnen Substanzen zu kennen.

Erst Augsberger 1951, 1954 war es, der versuchte, auf der Basis von experimentellen Ergebnissen in der Literatur meist

am Modell der Tachyarrhythmia absoluta die Digitalistherapie zu quantifizieren und eine Dosiswirkungsrelation bei der Therapie zu errechnen.

Die Möglichkeit, die Digitalisglykoside quantitativ in den Körperflüssigkeiten nachzuweisen, eröffnete sich mit der Isotopenmarkierung der Glykoside nach Wilzbach 1957. Diese Methode bahnte den Weg zur quantitativen Analyse des Digitalisstoffwechsels beim Menschen. Bis heute sind Analysemethoden (Tab. 3) entwickelt worden, die hochspezifisch sind und mit deren Hilfe es möglich ist, bis zu 10^{-10}g Digoxin/ml Serum bzw. Urin reproduzierbar nachzuweisen.

Von den Analysemethoden, die für die Bestimmung des Digoxins beschrieben worden sind, zeichnen sich die drei physikalisch chemischen Methoden, die Doppel-Isotopen-Verdünnungsmethode (Lukas et al. 1971), die Gaschromatographie (Jelliffe et al. 1963, Wilson 1967, Watson et al. 1971) sowie Dünnschichtchromatographie (Seipel et al. 1968, van Oostveen 1976) durch eine hohe Spezifität für Digoxin aus. Von erheblichem Nachteil sind die aufwendigen Extraktionen und Reinigungsschritte, die lange Zeit beanspruchen und deshalb keine größere Anzahl von Bestimmungen zulassen.

Vergleicht man diese Methoden mit dem Radioimmunoassay, das wir zur Analyse der Digoxinkonzentration im Serum und Urin benutzten, so unterscheidet es sich von den physikalisch chemischen Methoden durch einen sehr viel geringeren methodischen Aufwand. Extraktion des Digoxins aus dem Serum und Urin ist nicht notwendig. Gleichzeitig ist das Radioimmunoassay den Analysemethoden, die den Rezeptor des Digoxins an der Zellmembran in das Analysesystem einbeziehen, hinsichtlich der Spezifität deutlich überlegen.

Die Entwicklung eines eigenen Radioimmunoassay für Digoxin, wie wir sie verfolgt haben, bietet Vorteile gegenüber dem routinemäßigen Gebrauch einer fertigen Testpackung. Die

Methode zur Analyse von Digoxin im Serum und Urin

Physikalisch-chemische Trennung:	Doppel-Isotopen-Verdünnungsmethode
	Gaschromatographie
	Dünnschichtchromatographie
Na^+-K^+-ATPase Inhibition:	^{86}Rb-Aufnahmeinhibition
	Na^+-K^+-ATPase Enzymassay
Kompetitive Eiweißbindung:	Na^+-K^+-ATPase Rezeptorverdrängungsassay
	Radioimmunoassay
	Enzymimmunoassay

Tab. 3: Methoden zur Analyse von Digoxin im Serum und Urin.

Qualität eines Radioimmunoassays hängt weitgehend von der Spezifität des Antikörpers, der radioaktiven Markierung des Digoxins und der Trennungsmethode von gebundenem und ungebundenem Digoxin ab. Das Antiserum gegen Digoxin, das eigenständig hergestellt wird, kann auf seine Qualität hin überprüft werden und steht im allgemeinen über einen längeren Zeitraum unverändert zur Verfügung. Das Antiserum, das in den käuflichen Testpackungen verwendet wird, wird zwar in den meisten Fällen ausreichend charakterisiert, was seine Kreuzreaktivität und Spezifität angeht. Wechsel z.B. der Antikörpercharge werden jedoch nur selten für den Verbraucher klar herausgestellt. Da eine radioimmunologisch gemessene Serum-Digoxinkonzentration ohne Wissen um den Normbereich, der wiederum für jede Antikörpercharge neu zu bestimmen ist, von wenig Nutzen sein kann, können unbemerkt erhebliche Fehler auftreten.
Die Digoxin-Antikörper, wie wir sie verwenden, sind nach der Methode von Butler und Chen 1967 nach Kopplung an Albumin gewonnen worden. Da die Bindung an den Zucker erfolgt, ist das immunreaktive Ende des Moleküls, der Steroidring, frei zugänglich. Die Antikörper sind in der Lage, deshalb auch kleinste Änderungen in der Struktur des Steroidringes durch Änderungen der Bindungseigenschaften zu dokumentieren. Digoxin und seine Metaboliten bis zum Aglykon werden in etwa gleicher Weise nachgewiesen. Auch die an der Zuckerkette methylierten bzw. acetylierten Digoxinderivate reagieren unverändert mit dem Antikörper. Anders Digitoxin und Digitoxigenin. Sie werden zwar vom Antikörper gebunden, die Bindungsaffinität ist aber 25 bzw. 250-mal geringer. Die Steroidhormone, Spironolactone, Cholesterin und Chinidin zeigen in physiologischen Konzentrationen keine Kreuzreaktion.

Die Art des radioaktiven Tracers, also entweder ^{3}H-Digoxin oder das ^{125}J-markierte Glykosid gelten in ihrer Qualität heute als gleichwertig. Während die Betastrahlung des Tritium relativ aufwendig mittels Flüssigkeitsszintillationsmessung bestimmt werden muß, wird für ^{125}J lediglich

ein weniger aufwendiges Gammastrahlenmeßgerät benötigt. Die im allgemeinen höhere spezifische Aktivität des Jodtracers macht eine kürzere und genauere Auswertung der Radioaktivität möglich. Demgegenüber ist die Haltbarkeit des Jodtracers aufgrund der kürzeren Halbwertszeit begrenzt. Wir verwandten als Digoxintracer Tritium, weil es als spezifisch markiertes ^{3}H-Digoxin vorliegt, also dem Digoxin identisch ist im Gegensatz zum ^{125}J-Digoxin, bei dem ein Jod-markiertes Tyrosinmolekül an die Zuckerkette gekoppelt wird. Aus der spezifischen Markierung am Steroidring ergeben sich zwei Vorteile:

1. Eine völlige Identität des Moleküls von markiertem und unmarkiertem Digoxin. Markiertes und unmarkiertes Digoxin werden in diesem System vom Antikörper dementsprechend völlig gleich gebunden.

2. Die spezifische Isotopenmarkierung des Digoxins in 12-α -Position ist sehr stabil, während die Markierung an der Digitoxose des Glykosidmoleküls leicht abgespalten werden kann, z.B. beim Verlust der Zuckerkette.

Zur Trennung von Antikörper-gebundenem und ungebundenem Digoxin hat sich die dextranbeschichtete Holzkohle als zuverlässig erwiesen. Da die Holzkohle in der Lage ist, beliebig viel freies Digoxin aufzunehmen, ist die Dissoziationskonstante des Digoxin-Antikörperkomplexes ebenso von Bedeutung, wie die Kontaktzeit der Holzkohle mit dem Reaktionsgemisch. Daraus folgt, daß eine genaue Standardisierung der Kontaktzeit mit der Holzkohle nötig ist.

Die Genauigkeit des Radioimmunoassays in der von uns angewandten Form wurde gewährleistet einmal durch Dreifachbestimmung jedes Meßpunktes der Eichkurve und jedes zu analysierenden Serums oder Urins. Obwohl die Eichkurven der einzelnen Assays nur sehr geringe Unterschiede aufwiesen, wurde zu jedem Assay-Ansatz eine neue Eichkurve erstellt. Die Qualitätskontrolle der einzelnen Assay-Ansätze war gewährleistet durch die Mitbestimmung zweier

Standardseren (1,0 und 2,4 ng/ml), deren gemessene Digoxinkonzentration nicht mehr als eine Standardabweichung von der festgelegten Konzentration abweichen durfte. Falls diese Voraussetzung bei einem Assay-Ansatz nicht erreicht werden konnte, wurde er verworfen.

Das Radioimmunoassay der von uns verwendeten Anordnung ist eine Methode, die es zuläßt, im Serum wie auch im Urin Digoxin bis zu einer Konzentration von 0,2 ng/ml präzise und reproduzierbar nachzuweisen. Sie ist relativ wenig aufwendig und gestattet es, innerhalb von wenigen Stunden das Ergebnis einer Testreihe auch klinisch auszuwerten. Die Vorteile des Solid phase Assays haben wir bisher nicht genutzt, da die Beschichtigung der Reagenzglaswand mit unseren eigenen Antikörpern nicht präzise genug möglich war.

Die Messung der Eiweißbindung des Digoxins.

Die Eiweißbindung eines Arzneimittels, also hier des Digoxins, beeinflußt entscheidend die Gewebeverteilung, den therapeutischen Effekt, die glomeruläre Filtration und den Metabolismus des Herzglykosids. Lukas et al. 1969, Evered et al. 1972, Ohnhaus et al. 1972 und Storstein et al. 1976 konnten mit verschiedenen Methoden (Gelfiltration, Äquilibriumdialyse) eine Serumproteinbindung des Digoxins zwischen 20 und 30% nachweisen. Doherty et al. 1971 veröffentlichte erheblich niedrigere (weniger als 10%), Kuschinsky 1969 und Wallace et al. 1974 (bis zu 50%) wesentlich höhere Eiweißbindungsraten für Digoxin.

Unsere Methode, die auf die Arbeiten von Scholtan et al. 1966 und Benthe 1975 zurückgeht, ist ausreichend genau und reproduzierbar. Die Ergebnisse sind in guter Übereinstimmung mit der Mehrzahl der übrigen Untersuchungsgruppen. Wie auch Kramer et al. 1974 und Reidenberg et al. 1974, Koup et al. 1975 konnten wir eine signifikant geringere Eiweißbindung für Digoxin bei Patienten mit einer terminalen Niereninsuffizienz nachweisen. Die Ursache für diese Änderung der Eiweißbindung ist nach wie vor unbekannt.

Die praktische Bedeutung einer Erhöhung der freien Digoxinkonzentration ist gering, da z.B. eine Verminderung der Eiweißbindung von 22 auf 17%, die freie Digoxinkonzentration lediglich um 6,4% vergrößern würde. Nach Untersuchungen von Kramer et al. 1974 unterscheidet sich die Plasmaeiweißbindung des ß-Methyldigoxin nicht signifikant von der des Digoxin. Da ß-Acetyldigoxin im Blut nach per oraler Aufnahme ausschließlich in Form von Digoxin nachgewiesen werden kann, ist kein Unterschied in der Plasmaeiweißbindung dieser Substanz zu erwarten. Im Gegensatz dazu ermittelten Wirth et al. 1970 für ß-Methyldigoxin (11,9%) und α-Acetyldigoxin (14,6%) wesentlich geringere Serumeiweißbindungsraten.

Die Plasmaeiweißbindung des Digoxins beim Hund ist nicht signifikant verschieden von der des Menschen (Baggot et al. 1973). Der Vergleich der renalen Ausscheidung eines Arzneimittels, das überwiegend glomerulär filtriert wird, zwischen Versuchstier und Mensch ist nur dann sinnvoll, wenn zumindest die Plasmaeiweißbindung übereinstimmt; denn nur der freie Anteil des Plasmadigoxins steht zur glomerulären Filtration zur Verfügung. Im Gegensatz zur Auswirkung der Plasmaeiweißbindung des Digoxins auf die glomeruläre Filtration der Substanz ist ihre Bedeutung für die tubuläre Sekretion nicht bekannt. Da sich die Plasmaeiweißbindung beim Menschen und Hund aber auch die renale Digoxin-Elimination (Marcus et al. 1967) nicht wesentlich unterscheiden, ist der Hund als Modell für die renale Digoxin-Elimination geeignet.

Chinidinbestimmung im Serum.

Zur Analyse der Chinidinkonzentration im Serum wendeten wir die Doppelextraktionsmethode von Cramer et al. 1963 modifiziert von Kessler et al. 1974 an. Diese Methode ist in der Lage, sowohl Chinidin wie auch Dihydrochinidin spezifisch nachzuweisen, also neben der unveränderten Substanz den biologisch aktiven Metaboliten, während die

inaktiven polaren Metabolite nicht erfaßt werden (Alexander et al. 1974, Palmer et al. 1969).

Vergleicht man die von uns gemessenen Serum-Chinidinkonzentrationen (Tab. 14), so fällt auf, daß sie niedriger gemessen wurden als von Kessler et al. 1974 angegeben. Während diese Arbeitsgruppe unter einer mittleren Chinidindosierung von 1000 mg/die eine mittlere Chinidinserumkonzentration von 2,3 µg/ml nachweisen konnte, war die von uns unter gleichen Dosierungen gemessene mit 1,6 µg/ml deutlich kleiner. Der Grund dafür dürfte das lange Dosierungsintervall von 10 Stunden sein, an dessen Ende wir die Serum-Chinidinkonzentration untersuchten.

Die Absicht, den erzielten Effekt von Chinidin auf die renale Exkretion des Digoxins nicht nur einer Chinidindosis, sondern in einer gemessenen Serumkonzentration zuordnen zu können, wird mit dieser Bestimmungsmethode erreicht.

3. Die Bedeutung unterschiedlicher Methoden zur Messung der renalen Digoxin-Clearance.

Die Ergebnisse von Untersuchungen der renalen Digoxinclearances, die aus der Literatur zu entnehmen sind (Kapitel 1), sind teilweise sehr widersprüchlich. Da von verschiedenen Autoren durchaus unterschiedliche Methoden zur Messung der Digoxinclearance verwendet worden sind, haben wir uns entschlossen, den Einfluß der Methodik

- akute oder chronische Digitalisierung
- Berechnung der Clearance aus der gemessenen Radioaktivität im Serum und Urin
- Berechnung der Clearance aus der radioimmunologisch gemessenen Konzentration im Serum und Urin

im Versuch am Hund näher zu untersuchen.

3.1. Versuchsanordnung.

Die Versuche wurden an 28 Hunden beiderlei Geschlecht durchgeführt, deren Gewicht 20 bis 30 kg betrug. Nach Anästhesie mit 30 mg/kg Körpergewicht Pentobarbital i.v. wurden die Tiere intubiert und ventiliert. Die Atemfrequenz sowie das Atemzugvolumen wurden entsprechend dem Serum-pH, dem PO_2 und dem PCO_2 innerhalb der für den Hund geltenen Norm gehalten. Die Körpertemperatur wurde kontinuierlich mit einem rektalen Thermometer gemessen und durch eine Wärmedecke zwischen 36°C und 37°C konstant gehalten. Beide Femoralvenen und eine Femoralarterie wurden kanüliert, um Arzneimittel zu infundieren und den systemischen Blutdruck zu messen. Beide Nieren wurden transabdominal freigelegt, beide Ureteren kanüliert und der Urin von beiden Nieren separat gesammelt. Der systemische Blutdruck wurde mittels Statham P23db Druckübertragungselementen gemessen und aufgezeichnet. Ableitung II des EKG's nach Einthoven wurde während der gesamten Versuchsdauer registriert. Alle Tiere waren kreislaufstabil. Sie erhielten eine konstante Infusion von 10 ml/kg Körpergewicht/Std. einer physiologischen Kochsalzlösung. Es wurden keine Diuretika benutzt. Ein Hämatokritwert wurde am Beginn der Clearance-Messungen bestimmt.

Die 20 Tiere wurden in zwei Gruppen aufgeteilt. 10 Tiere erhielten eine konstante Infusion von 0,03 mg/kg Körpergewicht/Std. von Tritium-markiertem Digoxin, die anderen 10 hatten 0,03 mg Tritium-markiertes Digoxin/kg Körpergewicht täglich während 5 Tagen vor dem Experiment erhalten. Während des Experimentes wurde 1/24 der täglichen Digoxindosis pro Stunde infundiert.

Jeweils 5 Hunde in jeder Gruppe erhielten unspezifisch markiertes Digoxin (^{3}H-Digoxin Burroughs Wellcome Beckenham, Kent, spezifische Aktivität 500 µCi/mg), das mit unmarkiertem Digoxin bis auf eine spezifische Aktivität von 133 µCi/mg verdünnt wurde.

Den übrigen 5 Tieren in jeder Gruppe wurde spezifisch 12-α-Tritium-markiertes Digoxin (NEN Boston, spezifische Aktivität 18 mCi/mg), das ebenso mit unmarkiertem Digoxin

auf eine spezifische Aktivität von 133 /uCi/ml verdünnt wurde, infundiert. Um die renale Digoxin-Elimination der Hunde mit dem Glomerulusfiltrat vergleichen zu können, infundierten wir 15 /uCi ^{14}C-markiertes Inulin (NEN Boston, spezifische Aktivität 2,16 /uCi/g) nach einer initialen Bolusinjektion von 0,5 /uCi/kg Körpergewicht.

Nach dem oben beschriebenen chirurgischen Eingriff wurden die Inulin- und Digoxin-Infusionen begonnen. Nach 1 Stunde der konstanten Infusion und Verteilung wurden Digoxin- und Inulin-Clearances während vier aufeinanderfolgender 15-Min.-Perioden gemessen. Die Clearances von Digoxin und Inulin errechneten wir aus der Serum- und Urinradioaktivität, gemessen im Doppelisotopenzählverfahren in einem Flüssigkeitsszintillationsmeßsystem (Packard Modell 3030). Zusätzlich wurden die Digoxin- und Urinkonzentrationen der Versuchsgruppe, die 12-α ^{3}H-Digoxin über 5 Tage erhalten hatte, radioimmunologisch analysiert. Die Tritiumaktivität in den Seren und im Urin störte das Radioimmunoassay insofern nicht, als ein 100-facher Unterschied zwischen der spezifischen Aktivität des ^{3}H-Digoxins im Serum (133 /uCi/mg) und des des ^{3}H-Markers im Assay (18 mCi/mg) bestand. Der Einfluß des ^{14}C-Inulin auf die Messung der Radioaktivität war gering, da die Holzkohle mehr als 95% der ^{14}C-Counts absorbierte. Die ^{14}C-Aktivität wurde aber getrennt gemessen und ihr Einfluß auf die Messung der Tritiumaktivität berechnet und korrigiert. Alle Untersuchungen wurden dreifach durchgeführt.

Um den Einfluß der konstanten Zufuhr von 1/24 der täglichen Dosis auf die Bestimmung der Clearance zu überprüfen, führten wir weitere 5 Experimente ohne diese konstante Infusion durch. Entsprechend der oben beschriebenen Gruppe wurde 5 Hunden täglich während 5 Tagen vor Beginn des Experimentes 0,03 mg/kg 12α -^{3}H-Digoxin i.v. verabreicht. Die Clearances wurden entsprechend den oben beschriebenen Versuchen während vier 15 Min.-Perioden gemessen. Zusätzlich bestimmten wir die Digoxinkonzentration im Serum radioimmunologisch, um der gemessenen Radioaktivität eine Serum-Digoxinkonzentration korrelieren zu können.

Den Einfluß der Verteilungsphase bzw. Digoxinaufnahme in das Nierengewebe auf die renale Exkretion des Herzglykosides untersuchten wir an 5 weiteren Hunden. Alle erhielten eine konstante Dauerinfusion von 0,03 mg/kg Körpergewicht 12 α - ^{3}H-Digoxin. Den ersten 2 Hunden wurde nach 60 Min. die eine, nach 120 Min. die zweite Niere entnommen und die Radioaktivität im Nierengewebe gemessen. Um die Bedeutung der einseitigen Nephrektomie auf die Speicherung von Digoxin in der kontralateralen Niere zu untersuchen, wurde einer zweiten Gruppe von 3 Hunden beide Nieren nach einer Gesamtinfusionszeit von 120 Min. entnommen.

Antikörperbindungs-Untersuchung.

0,1 ml Serum, Urin oder Tritium-markiertes Digoxin in der während der Versuche verabreichten Form wurde zu 0,5 ml Phosphatpuffer und 0,5 ml menschlichem Serum zugegeben. Dazu wurden 0,1 ml eines unverdünnten Schafserums pipettiert, das von T.W.Smith in Boston zur Verfügung gestellt wurde und nach der von ihm selber (Smith et al. 1969) beschriebenen Methode hergestellt worden war. Die Antikörper entsprachen ihrer Bindungseigenschaften den von Smith 1969 veröffentlichten Anforderungen. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden 0,25 ml einer Dextranholzkohle-Suspension zugefügt. 5 Min. später wurde freies und Antikörper-gebundenes Digoxin durch Zentrifugation bei 2000 g für 20 Min. getrennt. Der Überstand wurde in ein Flüssigkeitsszintillationsgefäß dekantiert, in dem 10 ml Biofluor (NEN Boston) und 0,8 ml destilliertes Wasser eingefüllt worden waren. Die Radioaktivität wurde in einem Flüssigkeitsszintillationszähler gemessen. Der Anteil des Antikörper-gebundenen Digoxins wurde aus der Differenz zwischen Antikörper-gebundener Radioaktivität und der zugeführten Gesamtaktivität errechnet.

Die Bindung an Holzkohle wurde in dem gleichen Assay gemessen aber ohne Zusatz von Antikörper. Die Holzkohlegebundene Fraktion wurde errechnet, in dem die Radioaktivität im Überstand von der Gesamtaktivität, die dem System zugegeben worden war, abgezogen wurde.

Evaporationsversuch.

Um den flüchtigen Anteil der Radioaktivität in den Urin- und Serumproben zu bestimmen, wurden gleiche Mengen von je 1 ml einer Serum- oder Urinprobe in zwei Flüssigkeitsszintillationsmeßgefäße gefüllt. Während das eine Meßgefäß nach Zugabe von 10 ml Bioflour (NEN Boston) und 1 ml Aquabidest in einem Flüssigkeitsszintillationszähler auf seine Tritiumaktivität hin gemessen wurde, wurde der Inhalt des anderen Meßgefäßes in einem Dessikator getrocknet. Der Bodensatz wurde mit 1 ml Aquabidest aufgelöst und die Tritiumaktivität nach Zugabe von 10 ml Biofluor (NEN Boston) und 1 ml Aquabidest wie oben beschrieben gemessen.

Den Anteil der flüchtigen Radioaktivität errechneten wir aus der Differenz zwischen der gemessenen Tritiumaktivität ohne und der nach Evaporation. Zur Kontrolle der Wiederfindungsrate des Tritium wurde die ^{14}C-Aktivität in den Proben in gleicher Weise ausgewertet.

Evaporation von Tritium-markiertem Digoxin in einer wässrigen Lösung.

Um die Möglichkeit eines Tritiumaustausches zwischen dem ^{3}H-Digoxin und dem Wasser in einer wässrigen Lösung näher zu untersuchen, inkubierten wir unspezifisch ^{3}H-markiertes Digoxin (spezifische Aktivität 133 uCi/mg in Phosphatpuffer für 1, 2, 4, 8, 24, 48, 72, 96, 120 Stunden. Die Inkubation wurde bei 37°C in einem Wasserbad vorgenommen. 1 ml der Digoxinlösung wurde in ein Flüssigkeitsszintillationsmeßgefäß pipettiert, inkubiert und im Anschluß daran in einem Dessikator getrocknet. Der Inhalt eines jeden Meßgefäßes wurde dann mit 1 ml destilliertem Wasser aufgelöst. 10 ml Biofluor (NEN Boston) wurden zugegeben und die Radioaktivität gemessen. Die wiedergefundene Radioaktivität wurde als Prozentsatz der ursprünglich zugeführten Tritiumaktivität berechnet. Als Kontrolle diente eine Lösung von 12 α -^{3}H-markiertem Digoxin (spezifische Aktivität 133 uCi/mg), die nach der oben beschriebenen Methode bearbeitet und ausgewertet wurde.

3.2. Ergebnisse.

Akute Digitalisierung.

Unspezifisch ^{3}H-markiertes Digoxin (Tab. 4):

Bei den 5 Hunden, die eine konstante Infusion von 0,o3 mg/kg unspezifisch markiertem Digoxin erhielten, wurde ein mittlerer Blutdruck von 97 ± 26 mm Hg und ein Urinfluß von 1,24 ± 0,40 ml/min. gemessen. Inulin- und Digoxin-Clearances erreichten 30,9 ± 5,8 und 20,8 ± 3,2 ml/min. Das Verhältnis von Digoxin- zu Inulin-Clearance betrug 0,68 ± 0,05.

Spezifisch 12 α -^{3}H-markiertes Digoxin (Tab. 4):

Bei den 5 Hunden, die 0,03 mg/kg Körpergewicht 12 α -^{3}H-Digoxin als konstante Infusion während des Versuches erhalten hatten, wurde ein mittlerer Blutdruck von 94,0 ± 21 mm Hg sowie ein Urinfluß von 0,9 ± 0,2 ml/min. gemessen. Die Inulin-Clearance in dieser Gruppe wurde mit 23,0 ± 2,4 ml/min., die Digoxin-Clearance mit 16,6 ± 2,0 ml/min. errechnet. Das Verhältnis von Digoxin- zu Inulin-Clearance betrug 0,72 ± 0,12.

Chronische Digitalisierung.

Unspezifisch markiertes Digoxin (Tab. 4):

5 Hunde hatten 0,03 mg/kg Körpergewicht unspezifisch markiertes ^{3}H-Digoxin täglich für 5 Tage vor dem Experiment erhalten. Während des Experimentes wurde 1/24 der täglichen Erhaltungsdosis als Infusion zugeführt. Der mittlere Blutdruck wurde mit 104 ± 22 mm Hg, der Urinfluß mit 1,36 ± 1,00 ml/min. gemessen. Die Inulin-Clearance ermittelten wir mit 26,7 ± 8,7 ml/min. und die Digoxin-Clearance mit 13,0 ± 3,1 ml/min. Das Digoxin- zu Inulin-Clearance-Verhältnis wurde entsprechend niedrig mit 0,51 ± 0,11 errechnet.

	Digoxinclearance ml/min	Inulinclearance ml/min	Verhältnis Digoxin / Inulin Clearance
Akute Digitalisierung			
unspez. markiertes ^{3}H-Digoxin	20,8 ± 3,2	30,9 ± 5,8	0,68 ± 0,05
12α ^{3}H-Digoxin	16,6 ± 2,0	23,0 ± 2,4	0,72 ± 0,12
Chronische Digitalisierung			
unspez. markiertes ^{3}H-Digoxin	13,0 ± 3,1	26,7 ± 8,7	0,51 ± 0,11
12α ^{3}H-Digoxin	19,6 ± 2,0	23,7 ± 2,2	0,82 ± 0,04
Radioimmunoassay	18,6 ± 5,6	23,7 ± 2,2	0,79 ± 0,15

Tab. 4: Untersuchung der renalen Digoxin- und Inulin-Clearances bei 20 Hunden nach akuter und chronischer Digitalisierung. Die Digoxin-Clearances wurden errechnet aus der Tritium-aktivität (spezifisch und unspezifisch markiertes Digoxin) im Serum und Urin aus der radio-immunologisch analysierten Digoxinkonzentration im Serum und Urin der chronisch digitalisierten Hunde.

			Antikörperbindung (% ± SD)	Holzkohlebindung (% ± SD)
1) Unspezifisch ^{3}H markiertes Digoxin				
a)	Digoxinlösung		95,0 ± 4,3	95,1 ± 2,5
b)	Serum	akut	82,3 ± 3,8	55,2 ± 7,2
	n=4	chronisch	78,9 ± 3,5	51,9 ± 14,2
c)	Urin	akut	77,6 ± 4,3	94,2 ± 2,4
	n=4	chronisch	61,7 ± 6,8	88,0 ± 2,9
2) Spezifisch 12α ^{3}H markiertes Digoxin				
a)	Digoxinlösung		97,4 ± 4,0	99,6 ± 2,1
b)	Serum	akut	84,2 ± 3,7	98,8 ± 2,8
	n=4	chronisch	52,7 ± 5,6	89,2 ± 4,1
c)	Urin	akut	71,2 ± 6,6	98,9 ± 2,5
	n=4	chronisch	51,9 ± 10,3	96,1 ± 2,7

Tab. 5: Untersuchung zur Bindung des Tritium (unspezifisch und spezifisch markiertes ^{3}H-Digoxin) in der Injektionslösung, dem Serum und dem Urin der Hunde nach akuter und chronischer Digoxingabe an den Digoxin-spezifischen Antikörper und an dextran-beschichtete Holzkohle.

Spezifisch 12 α -^{3}H-markiertes Digoxin (Tab. 4):

Die letzte Gruppe von 5 Tieren hatte 12 α -^{3}H-Digoxin in der gleichen Dosis wie die vorangehende erhalten. In dieser Gruppe wurde der mittlere arterielle Blutdruck mit 91 ± 22 mm Hg und der Urinfluß mit 1,3 ± 0,4 ml/min. gemessen. Die Inulin-Clearance wurde mit 23,7 ± 2,2 und die Digoxin-Clearance mit 19,6 ± 2,0 ml/min. errechnet. Das Verhältnis von Digoxin- zu Inulin-Clearance war 0,82 ± 0,04.

Digoxin radioimmunologisch gemessen (Tab. 4):

In der Gruppe von 5 Hunden, die 0,03 mg/kg Körpergewicht täglich für 5 Tage i.v. erhalten hatten, wurde die Digoxin-Clearance zusätzlich radioimmunologisch bestimmt. Mit dieser Methode wurde für die Digoxin-Clearance ein Wert von 18,6 ± 5,6 ml/min. gemessen. Das Digoxin- zu Inulin-Clearance-Verhältnis berechnete sich entsprechend mit 0,79 ± 0,15.

Die Infusion von 1/24 der täglichen Digoxindosis/Std. hatte keinen Einfluß auf den Exkretionsmechanismus des Digoxin. Das Verhältnis von Digoxin- zu Inulin-Clearance wurde mit 0,81 ± 0,09 in der Gruppe der chronisch digitalisierten Hunde, die keine Infusion erhalten hatten, nicht signifikant verschieden gemessen.

Vergleicht man nun die Werte für das Verhältnis von Digoxin- zu Inulin-Clearance von allen Hunden, die chronisch digitalisiert worden waren (0,82 ± 0,08) mit denen, die Digoxin als Dauerinfusion erhalten hatten (0,73 ± 0,09), so ist der Unterschied signifikant ($p < 0{,}038$). Um näheren Aufschluß über die Ursachen dieser Unterschiede zu erhalten, bestimmten wir die Digoxinaufnahme in die Niere nach 60 und 120 Min. einer konstanten Infusion von 0,03 mg/kg 12 α -^{3}H-Digoxin/Std. Die Digoxingewebekonzentration stieg von 168 ± 22 ng/g Nierengewebe nach 60 Min. auf 386 ± 108 ng/g Nierengewebe nach 120 Min. an.

Bindung der Radioaktivität an Antikörper sowie dextranbeschichtete Holzkohle.

Beide Digoxinpräparate wurden sowohl vom Antikörper wie auch von der Holzkohle zu mehr als 95% gebunden, in der Form, in der sie den Hunden verabreicht worden waren.

Die Radioaktivität im Serum und Urin der Tiere, die akut 12 α -^{3}H- und unspezifisch markiertes ^{3}H-Digoxin erhalten hatten, wurde zu 70 - 85% vom Antikörper adsorbiert. Die Holzkohle konnte fast 99% der Radioaktivität im Serum und Urin der Tiere, die mit 12 α -^{3}H-Digoxin behandelt worden waren, binden, aber nur 94% im Urin und 55% im Serum der Tiere, denen unspezifisch markiertes Digoxin infundiert worden war (Tab. 5).

Nach chronischer Digitalisierung fanden wir erheblich größere Unterschiede. Die Radioaktivität im Serum und Urin der Hunde, die mit 12 α -^{3}H-markiertem Digoxin digitalisiert worden waren, wurden zu 53 bzw. 52% vom Antikörper, aber zu 89 bzw. 96% von Holzkohle gebunden. In der Gruppe, die chronisch mit unspezifisch markiertem Digoxin behandelt worden war, wurden 79% der Radioaktivität im Serum und 62% im Urin vom Antikörper gebunden, aber nur 52% im Serum und 88% im Urin von Holzkohle (Tab. 5).

Flüchtige Radioaktivität.

Die Radioaktivität der Digoxinlösung, die zur Digitalisierung benutzt worden war, wurde sowohl im Falle des unspezifisch markierten ^{3}H-Digoxins (spezifische Aktivität 133 µCi/mg) wie auch in dem des 12 α -^{3}H-markierten Digoxins (spezifische Aktivität 133 µCi/mg) auch nach Evaporation zu fast 100% wiedergefunden. Etwa der gleiche Anteil der Radioaktivität wurde im Serum und Urin der Tiere nach Austrocknung wiedergefunden, die 12 α -^{3}H-Digoxin im akuten Versuch erhalten hatten im Gegensatz zu denen, die chronisch damit behandelt worden waren. Bei diesen war der wiedergefundene Anteil kleiner aber nicht signifikant kleiner.

In der Gruppe der Tiere, die mit unspezifisch ^{3}H-markiertem Digoxin behandelt worden waren, fanden wir signifikante Unterschiede. In der chronisch digitalisierten Gruppe konnten wir lediglich 21% der Radioaktivität nach Evaporation des Serums und 67% nach Evaporation des Urins nachweisen. In der akut digitalisierten Gruppe fanden wir 40% der Radioaktivität im Serum und 85% im Urin auch nach Evaporation wieder (Tab. 6).

Nach Inkubation von spezifisch und unspezifisch markiertem Digoxin in einer wässrigen Lösung konnte bereits nach einer 72-stündigen Inkubationszeit ein Teil des Tritium, des unspezifisch markierten Glykosides evaporiert werden (Tab. 7).

3.3. Diskussion.

Diese Studie wurde durchgeführt, um den Einfluß der verschiedenen experimentellen Methoden auf die Clearance-Messungen und damit auch auf den daraus zu folgernden Exkretionsmechanismus des Digoxin zu untersuchen.

Als Parameter für das Glomerulusfiltrat wählten wir bewußt Inulin, weil bekannt ist, daß es ausschließlich glomerulär filtriert wird. Kreatinin wird zwar weit verbreitet als Marker des Glomerulusfiltrates benutzt, da Clearance-Messungen sehr einfach und wenig eingreifend sind. Kreatinin hat jedoch zwei Nachteile gegenüber dem Inulin.

a) Es wird tubulär sezerniert bei stark eingeschränktem Glomerulusfiltrat,
b) die laborchemische Analyse im Serum und Urin ist problematisch. Der mögliche Fehler ist erheblich und kann noch dadurch vergrößert werden, daß für Clearance-Messungen zwei Kreatininanalysen notwendig sind.

Evaporation	Serum (% ± SD) n = 5	Urin (% ± SD) n = 5
akute Digitalisierung		
unspezifisch ^{3}H markiertes Digoxin	40,0 ± 4,5	85,0 ± 7,5
Inulin	90,0 ± 3,1	98,5 ± 2,5
12α ^{3}H-Digoxin	99,0 ± 3,7	99,0 ± 5,7
Inulin	96,3 ± 5,9	98,2 ± 7,9
chronische Digitalisierung		
unspezifisch ^{3}H markiertes Digoxin	21,1 ± 6,3	66,6 ± 11,3
Inulin	98,3 ± 3,8	99,4 ± 7,5
12α ^{3}H-Digoxin	84,0 ± 16,0	97,2 ± 10,9
Inulin	96,0 ± 4,7	100,9 ± 10,2

Tab. 6: Untersuchungen zur Evaporation von Tritium, das den Tieren als spezifisch und unspezifisch markiertes Digoxin akut und chronisch verabreicht worden war. Die Prozentangaben bezeichnen den nach Evaporation im Urin und Serum wiedergefundenen Anteil der ursprünglichen Radioaktivität. Als Kontrolle der Wiederfindungsrate diente ^{14}C-Inulin.

Evaporation der Digoxinlösung (% Counts wiedergefunden)

Evaporation (in Stunden)	12α ^{3}H-Digoxin	unspezifisch markiertes ^{3}H-Digoxin
1	101	98
2	102	101
4	100	99
8	102	101
24	102	99
32	99	101
48	101	97
72	99	94
96	99	94
144	98	90

Tab. 7: Untersuchung zur Stabilität der Tritium-markierung in einer wässrigen Lösung. Die Prozentsätze geben den Anteil der nach Evaporation der wässrigen ^{3}H-Digoxinlösung (spezifisch und unspezifisch markiertes Digoxin) wiedergefundenen Radioaktivität an.

Digoxin-Elimination bei chronisch digitalisierten Hunden.

Bei Hunden, denen 12 α -^{3}H-Digoxin verabreicht worden war, konnten wir ein Verhältnis von Digoxin- zu Inulin-Clearance von 0,82 messen. Wurden die Digoxinkonzentrationen radioimmunologisch analysiert, so führte dies zu einem ähnlichen Resultat, nämlich 0,79. Dieser geringe Unterschied könnte als Ausdruck zweier verschiedener Methoden akzeptiert werden. Ursächlich könnten metabolische Änderungen des Digoxins verantwortlich sein, bei denen die Radioaktivität nicht betroffen ist, aber das Molekül soweit umgewandelt wird, daß es nicht länger vom spezifischen Antikörper gebunden wird (z.B.Glukoronide oder Sulfate).

Die Bedeutung des Metabolismus wird an Hand unserer Antikörperbindungsstudien demonstriert. 52,7% der Radioaktivität im Serum und 51,9% im Urin der mit 12 α -^{3}H-Digoxin chronisch behandelten Tiere wurden vom spezifischen Antikörper als Digoxin oder einer seiner kardioaktiven Metaboliten erkannt. Die Holzkohle bindet sehr viel mehr der Radioaktivität. Dies ist nicht überraschend, da die wasserlösliche Fraktion der Digoxinmetaboliten (z.B. Sulfate, Glukoronide) nicht vom Antikörper, aber von der Holzkohle gebunden werden.

Im Gegensatz zu diesen Resultaten fanden wir bei Hunden, die mit unspezifisch markiertem ^{3}H-Digoxin chronisch behandelt worden waren, ein Verhältnis von Digoxin- zu Inulin-Clearance von nur 0,51. Wie wir in unseren Evaporationsexperimenten zeigen konnten, ist ein erheblich größerer Anteil der Radioaktivität im Urin und Serum der mit unspezifisch im Gegensatz zu der mit spezifisch markiertem Digoxin behandelten Versuchsgruppe flüchtig und kann deshalb nicht mehr an Digoxin gebunden sein.

Zwei Argumente sprechen für die Hypothese, daß ein Tritiumaustausch mit Wasser stattfindet:

a) Die zunächst überraschend hohe tubuläre Reabsorption der Radioaktivität würde dadurch erklärt, daß Wasser vollständig in die Niere reabsorbiert wird.

b) Wenn dies so wäre, sollte Tritiumwasser in geringeren Mengen im Urin als im Serum gefunden werden.

Beides konnten wir in unseren Experimenten zeigen.

Wir haben bisher weder chemisch noch physikalisch die Anwesenheit von Tritiumwasser nachweisen können, weil die Menge, die im Urin und Serum gefunden wird, sehr klein ist und nicht konzentriert werden kann, ohne daß die fragliche Substanz verlorengeht. Doch ist aufgrund unserer Resultate naheliegend, daß Wasser die Substanz ist, mit der ein Tritiumaustausch stattfindet. Je größer der Anteil der flüchtigen Radioaktivität war, den wir fanden, umso höher war die scheinbar gemessene tubuläre Reabsorption. Im Gegensatz zu Digoxin wird das Wasser fast vollständig in den Nieren reabsorbiert. Ein weiterer Hinweis auf einen Tritiumaustausch mit Wasser ist abzuleiten aus unseren Untersuchungen zur Stabilität des Tritium-Markers in wässriger Lösung. Bereits nach 72 Stunden Inkubation in einer wässrigen Lösung war ein Teil des unspezifisch an das Digoxin gebundene Tritium evaporierbar im Gegensatz zu den stabileren spezifisch markierten.

Digoxin-Elimination bei akut digitalisierten Hunden.

In der Gruppe der akut digitalisierten Hunde, die mit 12 α -^{3}H-Digoxin behandelt wurden, konnten im Vergleich zur chronisch digitalisierten kleinere Verhältnisse von Digoxin- zu Inulin-Clearances (0,72 gegenüber 0,82) nachgewiesen werden.

Gegensätzliche Ergebnisse erhielten wir in der Gruppe der Hunde, die mit unspezifisch markiertem ^{3}H-Digoxin behandelt worden waren. Hier stieg das Verhältnis von Digoxin- zu Inulin-Clearance im Vergleich zu den chronischen Experimenten (0,68 gegenüber 0,51) relativ an. Der Grund dafür kann aus den Resultaten unserer Evaporationsexperimente abgeleitet werden. Vergleicht man die Stabilität des unspezifisch an Digoxin gebundenen Tritium in der akut und chronisch digitalisierten Versuchsgruppe, so fällt auf, daß in der ersteren ein größerer Anteil der

Radioaktivität im Serum und Urin stabil, also nicht evaporierbar war. Dies läßt annehmen, daß ein erheblich geringerer Tritiumaustausch in dieser Gruppe verglichen mit der chronisch digitalisierten stattgefunden hat. Ein vergleichsweise geringerer Anteil an Tritiumwasser sollte, wie oben diskutiert, die scheinbare Digoxin-Reabsorption vermindern und so eine höhere Clearance bewirken.

Digoxin-Clearances bei chronisch digitalisierten Hunden, errechnet aus den radioimmunologisch gemessenen Digoxinkonzentrationen im Serum und Urin.

Die Analyse des Digoxins mit Hilfe des Radioimmunoassays führt zu einer dritten Gruppe von Resultaten. Da die Tritiummarkierung auch Metaboliten anhaften bleibt, die vom Antikörper nicht mehr gebunden werden, wie z.B. Sulfate oder Glukoronide, ist die radioimmunologisch erfaßbare Glykosidfraktion nicht der gemessenen Radioaktivität im Serum und Urin gleichzusetzen.

Um die Ursache für die Unterschiede in der Exkretion von 12 α -^{3}H-Digoxin während akuter und nach chronischer Verabreichung zu ergründen, haben wir einmal die arteriovenöse Differenz von Digoxin nach intravenöser Gabe in den Nierengefäßen gemessen. Zusätzlich untersuchten wir die Digoxinkonzentration des Nierengewebes nach 60 und 120 Min. einer konstanten Digoxininfusion (0,03 mg/kg Körpergewicht/Std.).

Während eine Änderung der arteriovenösen Differenz nach 20 Min. Infusion nicht mehr nachzuweisen war, stieg die Digoxinkonzentration im Nierengewebe von 168 $\pm$ 22 ng/g Nierengewebe nach 60 Min., auf 386 $\pm$ 108 ng/g Nierengewebe, nach 120 Min. an. Dieser Anstieg ist nicht allein mit der gleichzeitigen Steigerung der Serum-Digoxinkonzentration zu erklären. Während die Digoxinkonzentration im Nierengewebe während dieser Zeit um 230% anstieg, erhöhte sich die Serum-Digoxinkonzentration lediglich um 129%. Daraus ist zu schließen, daß die Digoxin-Clearance, gemessen während der Phase der Digitalisierung, niedriger

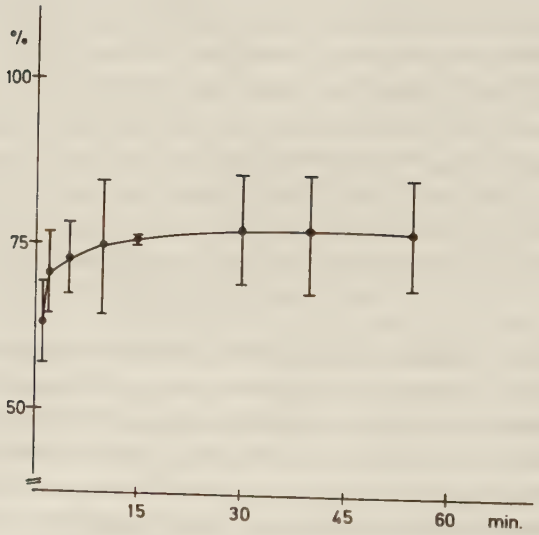

Abb. 3: ^{3}H-Digoxin-Konzentration im renal-venösen Serum in % der ^{3}H-Digoxin-Konzentration im renal-arteriellen Serum.

gemessen wird, weil die Digoxin-Gewebeaufnahme die Ausscheidung relativ verringert.

Vergleicht man die Ergebnisse dieser Studie mit denen in der Literatur, so ist festzustellen, daß die Autoren, die Tritium-markiertes Digoxin für ihre Untersuchungen verwendeten (Bloom et al. 1966, Ewy et al. 1969, Doherty et al. 1972) ein Verhältnis von Digoxin- zur Inulin-Clearance von ≤ 1 nachweisen konnten. Da spezifisch 12 α -markiertes Digoxin zu dieser Zeit nicht zur Verfügung stand, ist der Schluß naheliegend, daß die mangelnde Stabilität des Tritiumlabels für die scheinbar gemessene tubuläre Reabsorption von Bedeutung ist.

Die Autoren, die die Serum- und Digoxinkonzentrationen radioimmunologisch analysierten, konnten durchweg ein Verhältnis von Digoxin- zur Inulin-Clearance von ≥ 1 nachweisen (Falch et al. 1973, Jusko et al. 1974, Iisalo et al. 1974, Steiness 1974, Risler et al. 1974, van der Vijgh et al. 1977). Demgegenüber ist eine akute oder chronische Digitalisierung von geringerer Bedeutung, solange die Clearance im steady state gemessen wurde.

Wie auch wir konnten Doherty et al. 1969 beim Hund im Akutversuch nach Gabe von unspezifisch markiertem ^{3}H-Digoxin vor Erreichen des steady state eine scheinbar erhebliche tubuläre Reabsorption des Digoxin nachweisen.

Im Gegensatz dazu hat die Clearance-Messung nach Gabe einer Einzeldosis und erfolgter Verteilung keinen wesentlichen Effekt auf die erzielten Ergebnisse (Koup et al. 1975).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß methodische Unterschiede zu ganz erheblichen Differenzen zwischen Resultaten von experimentellen Digoxin-Clearance-Messungen führen. Akute oder chronische Digoxingabe bewirken einen scheinbar unterschiedlichen Exkretionsmechanismus des Digoxins in der Niere, wenn die Clearance-Messungen vor Erreichen eines steady state vorgenommen

werden. Daneben erscheint uns die Spezifität der Tritium-markierung des Digoxins weitgehend verantwortlich für widersprüchliche Versuchsergebnisse zu sein, wie schon von Weaver et al. 1977 aufgrund von pharmakokinetischen Studien an der Katze vermutet wurde.

Da Digoxin renal nur wenig metabolisiert ausgeschieden wird, erscheint die Messung der renalen Digoxin-Clearance unter Verwendung von spezifisch Tritium-markiertem Digoxin ebenso geeignet zu sein, wie deren Errechnung aus den radioimmunologisch gemessenen Digoxinkonzentrationen im Serum und Urin.

4. Der renale Ausscheidungsmechanismus des Digoxins und seiner Derivate beim Menschen und Hund.

Über die Niere verläuft der Hauptausscheidungsweg des Digoxins beim Menschen (Doherty et al. 1973, Falch et al. 1973, Grosse-Brockhoff et al. 1973) und beim Hund, dessen Digoxinkinetik der des Menschen sehr ähnlich ist (Marcus et al. 1967, Doherty et al. 1969). Drei Exkretions-mechanismen könnten eine Rolle spielen bei der renalen Ausscheidung des Digoxins:

Die glomeruläre Filtration, die tubuläre Reabsorption und die tubuläre Sekretion.

4.1. Versuchsanordnung.

Um einen genauen Einblick in die Vorgänge zu erhalten, die bei der renalen Exkretion des Digoxin eine Rolle spielen, wurden bei je 19 Patienten die Inulin-, PAH- und die ß-Acetyl- bzw. ß-Methyldigoxin-Clearance gemessen. Zusätzlich verglichen wir die renale Digoxin-Clearance mit der Inulin-Clearance bei 10 Hunden.

A. ß-Acetyldigoxin:
Von den 19 Patienten waren 9 Männer und 10 Frauen, deren mittleres Alter 37 Jahre betrug. Die bei den Patienten gemessenen Laborparameter sind aus der Tabelle 8 zu ersehen. Eine Hypoalbuminämie wurde bei keinem Patienten gemessen. Patienten mit einer Proteinurie von mehr als 0,1 g/l wurden von der Untersuchung ausgeschlossen. Initial erhielten die Patienten 3 x 0,8 mg ß-Acetyldigoxin (Novodigal, Fa. Beiersdorf, Hamburg) und in der Folgezeit 0,4 mg ß-Acetyldigoxin täglich per oral. Die Digitalis-Dauertherapie war über mindestens 2 Wochen vor dem Versuch beibehalten worden. Die letzte Digitalisdosis erhielten alle Patienten 24 Stunden vor der Clearanceuntersuchung. Die Inulin-, PAH- und Digoxin-Clearance-Messungen wurden, wie oben angegeben, ausgeführt. Drei 20-minütige Urinsammelperioden wurden ausgewertet.

B. ß-Methyldigoxin:
Der Untersuchung wurden 19 Patienten unterzogen, deren mittleres Alter 52 Jahre betrug. Die Laborparameter sind aus der Tabelle 9 zu ersehen. Auch bei diesen Patienten war keine Proteinurie von mehr als 0,1 g/l zum Zeitpunkt der Untersuchung nachzuweisen. Die Patienten erhielten initial 3 x 0,6 mg ß-Methyldigoxin (Lanitop, Fa. Boehringer, Mannheim) und im Anschluß daran täglich 0,2 mg ß-Methyldigoxin per oral als tägliche Dauermedikation. Zusammen mit der Inulin- und PAH-Clearance konnten wir die Digoxin-Clearances entsprechend den oben gegebenen Angaben messen, wobei radioimmunologisch nicht zwischen

Patienten :

Anzahl	19
Alter	37 ± 15 Jahre
Serumkreatinin	0,83 ± 0,21 mg %
Gesamteiweiß	6,86 ± 0,45 g %
Serumalbumin	4,02 ± 0,34 g %
Serumdigoxin	1,1 ± 0,4 ng / ml

Tab. 8: Kenndaten der 19 Patienten, deren renale Digoxin-Clearances gemessen wurden und nach mehrwöchiger Einnahme von 0,4 mg ß-Acetyldigoxin täglich.

Patienten :

Anzahl	19
Alter	52 ± 15 Jahre
Serumkreatinin	0,85 ± 0,14 mg %
Gesamteiweiss	7,10 ± 0,80 g %
Serumalbumin	3,91 ± 0,53 g %
Serumdigoxin (methyl - Digoxin)	0,9 ± 0,2 ng/ml

Tab. 9: Kenndaten der 19 Patienten, deren renale Digoxin-Clearances gemessen wurden nach mehrwöchiger Einnahme von 0,2 mg ß-Methyl-digoxin täglich.

Digoxin- und ß-Methyldigoxin unterschieden werden kann. Auch hier wurden drei 20-minütige Urinsammelperioden ausgewertet.

C. Tierversuch:
10 Hunde erhielten an 5 Tagen vor Beginn des Versuches täglich eine einmalige intravenöse Dosis von 0,03 mg 12-α ^{3}H-Digoxin (spezifische Aktivität 133 mCi/mg, NEN Boston). Der Versuchsaufbau entsprach dem in Kapitel 3 beschriebenen. Es wurden gleichzeitig die Inulin- und die Digoxin-Clearance während vier 15-minütigen Sammelperioden ausgewertet.

4.2. Ergebnisse.

ß-Acetyldigoxin: Bei 19 Patienten, die eine tägliche Dosis von 0,4 mg ß-Acetyldigoxin erhalten hatten, wurde eine mittlere Digoxin-Clearance von 109 $\pm$ 29 ml/min./1,73 m^2 gemessen. Die gleichzeitig ermittelte Inulin-Clearance (95 $\pm$ 22 ml/min./1,73 m^2) korrelierte signifikant ($p < 0,001$) mit der Digoxin-Clearance, war aber signifikant kleiner ($p < 0,01$) als die Digoxin-Clearance. Das Verhältnis von Digoxin- zu Inulin-Clearance wurde mit 1,15 errechnet. Die PAH-Clearance als Parameter der Nierendurchblutung wurde mit 483 $\pm$ 130 ml/min./1,73 m^2 gemessen.

ß-Methyldigoxin: Die Digoxin-Clearance von 19 Patienten, die täglich 0,2 mg ß-Methyldigoxin per oral erhalten hatten, wurde mit 75 $\pm$ 15 ml/min./1,73 m^2 gemessen. Sie war signifikant niedriger ($p < 0,01$) als die gleichzeitig ermittelte Inulin-Clearance (86 $\pm$ 19 ml/min./1,73 m^2). Digoxin- und Inulin-Clearance korrelierten signifikant ($p < 0,01$). Das Verhältnis von ß-Methyldigoxin zu Inulin-Clearance wurde mit 0,87 errechnet. Die PAH-Clearance wurde mit 409 $\pm$ 147 ml/min./1,73 m^2 ebenso wie die Inulin-Clearance im unteren Drittel der altersentsprechenden Norm gefunden.

Inulin	95 ± 22 ml/min/1,73 m^2
PAH	483 ± 130 ml/min/1,73 m^2
Digoxin	109 ± 29 ml/min/1,73 m^2

Tab. 10: Renale Digoxin-Clearances, gemessen bei 19 Patienten, die 0,4 mg ß-Acetyldigoxin per oral als Dauermedikation eingenommen hatten.

Inulin	86 ± 19 ml/min/1,73 m^2
PAH	409 ± 147 ml/min/1,73 m^2
Digoxin (β-Methyl)	75 ± 15 ml/min/1,73 m^2

Tab. 11: Renale Clearances, gemessen bei 19 Patienten, die 0,2 mg ß-Methyldigoxin per oral als Dauermedikation eingenommen hatten.

Tierversuch: Bei 10 Hunden, die während 5 Tagen vor der Clearanceuntersuchung jeweils 0,03 mg/kg Körpergewicht Tritium-markiertes Digoxin erhalten hatte, wurde eine mittlere Digoxin-Clearance von 20,1 $\pm$ 2,1 ml/min. und eine Inulin-Clearance von 24,4 $\pm$ 2,3 ml/min. gemessen. Das Verhältnis von Digoxin- zu Inulin-Clearance errechnete sich mit 0,82. Digoxin- und Inulin-Clearance korrelierten auch hier signifikant ($p < 0,001$).

4.3. Diskussion.

Um genauen Einblick in die Vorgänge zu erhalten, haben wir unter genau festgelegten experimentellen Bedingungen die renale Digoxin-Clearance beim Menschen und beim Hund untersucht. Wir benutzten das Verhältnis von Digoxin- zu Inulin-Clearance als einen Indikator für den renalen Exkretionsmechanismus. Digoxin ist im Serum zu ca. 20% proteingebunden sowohl beim Menschen wie auch beim Hund im Gegensatz zu Inulin, das völlig ungebunden ist. Da nur die nicht eiweißgebundene Fraktion glomerulär filtriert werden kann. würde ein Verhältnis von Digoxin- zu Inulin-Clearance von 0,8 für eine ausschließlich glomeruläre Filtration des Digoxin sprechen. Beim Menschen fanden wir nach per oraler Gabe von ß-Acetyldigoxin ein Verhältnis von Digoxin- zu Inulin-Clearance von 1,15 und entsprechend für ß-Methyldigoxin eines von 0,87. Da ß-Acetyldigoxin nach per oraler Aufnahme bereits in der Darmwand desacetyliert wird (Ruiz-Torres et al. 1972, Flasch 1976), ist sein renaler Ausscheidungsmechanismus mit dem des Digoxin identisch. Unsere Ergebnisse sind in guter Übereinstimmung mit denen von Steiness 1974 und Koup et al. 1975, die ebenso wie wir ein Digoxin- zu Inulin-Clearance-Verhältnis von deutlich über 1 nachweisen konnten.

Im Gegensatz dazu wird beim ß-Methyldigoxin nach unseren Untersuchungen, die auch von Larbig et al. 1976 bestätigt wurden, beim Menschen von der Niere anders als unverändertes Digoxin ausgeschieden. Das Verhältnis von Digoxin- zu Inulin-Clearance wurde für ß-Methyldigoxin mit 0,87 im Gegensatz zu 1,15 signifikant kleiner gemessen. Da die Serumproteinbindung des ß-Methyldigoxins der des Digoxin entspricht (Kramer et al. 1974), muß ein unterschiedlicher renaler Exkretionsmechanismus für das ß-Methyldigoxin angenommen werden. Digoxin und ß-Methyldigoxin unterscheiden sich erheblich in ihren physikochemischen Eigenschaften. ß-Methyldigoxin ist wesentlich weniger polar und deshalb besser fettlöslich als Digoxin. Diese Eigenschaften könnten eine erhebliche Bedeutung für den renalen Exkretionsmechanismus haben, da lipophilere Substanzen leichter tubulär absorbiert werden.
Die Clearance von ß-Methyldigoxin, die wir gemessen haben, ist im Gegensatz zu der gemessenen bei unverändertem Digoxin mit großer Wahrscheinlichkeit die Summe aus zwei unterschiedlichen Größen. Während Digoxin im Urin nur wenig verändert erscheint, wird die Methylgruppe von ß-Methyldigoxin nur langsam abgespalten. Im Serum wie auch im Urin sind deshalb Digoxin und ß-Methyldigoxin nachzuweisen (Rietbrock et al. 1975). Da unsere Bestimmungsmethode für Digoxin, das Radioimmunoassay, nicht zwischen den beiden Substanzen unterscheiden kann, messen wir beide als Summe aus den Einzelsubstanzen. Es ist also durchaus denkbar, daß ß-Methyldigoxin erheblich tubulär reabsorbiert und das Digoxin tubulär sezerniert wird. Folglich würden wir ein Ergebnis für das Verhältnis von Digoxin- zu Inulin-Clearance erhalten, das deutlich unter dem für Digoxin gemessenen liegt. Wir können also nicht aus der gemessenen Zahl 0,87 ohne weiteres auf den Exkretionsmechanismus für ß-Methyldigoxin schließen.

Im Gegensatz zu ß-Methyldigoxin wird das α -Acetyldigoxin wesentlich schneller und vollständiger desacetyliert. Im Serum und Urin sind nach Benthe 1972 aber noch geringe

Mengen des acetylierten Glykosids nachweisbar.
Brass 1970 verglich die renale Clearance von α-Acetyldigoxin mit der des Inulin und konnte keinen wesentlichen Unterschied feststellen. Da α -Acetyldigoxin zwischen 10 und 20% an Serumeiweiß gebunden ist, spricht dieses Ergebnis für eine vorwiegende glomeruläre Filtration des Digoxins, aber auch für eine zusätzliche tubuläre Sekretion des unveränderten und eine tubuläre Reabsorption des α-Acetyldigoxins. α -Acetyldigoxin nimmt also eine Zwischenstellung zwischen ß-Methyldigoxin und Digoxin ein, was den renalen Exkretionsmechanismus angeht. Es ist naheligend, diese Unterschiede auf den Anteil der lipophileren ß-Methyl- und α -Acetylderivate im Serum und Urin zurückzuführen, die offensichtlich renal anders eliminiert werden als unverändertes Digoxin.

Für die Elimination von Digoxin beim Hund spielt offenbar die glomeruläre Filtration die Hauptrolle. Das Verhältnis von Digoxin- zu Inulin-Clearance wurde mit 0,82 in einer Größenordnung gefunden, die, wie oben ausgeführt, bei einer fast ausschließlich glomerulären Filtration des Digoxin zu erwarten wäre. Doherty et al.1969 fanden bei ihren Versuchen, bei denen sie beim Hund die renale Elimination des Digoxins mit Hilfe der Stop Flow-Technik untersuchten, eine zusätzliche tubuläre Absorption des Digoxin. Diese Ergebnisse sind mit unseren nicht vergleichbar, da sie bei akut digitalisierten Tieren vor Erreichen eines Steady state ermittelt wurden.

5. Der renale Exkretionsmechanismus von Digoxin bei akuter Niereninsuffizienz.

Im Gegensatz zu der großen Zahl von Untersuchungen der renalen Digoxin-Elimination bei chronischer Niereninsuffizienz ist die Ausscheidung dieses Herzglykosides bei der akuten Niereninsuffizienz nicht untersucht.

Die renale Ausscheidung von Digoxin bei akutem Nierenversagen ist von großer praktischer Bedeutung, da es häufig von einer Herzinsuffizienz begleitet wird, die eine Digitalistherapie notwendig macht. Die renale Elimination von Digoxin wird im Verlaufe eines progredienten Nierenversagens eingeschränkt. Ungeklärt ist aber, ob die Ausscheidung entsprechend der Verhältnisse bei der chronischen Niereninsuffizienz mit der Einschränkung der glomerulären Filtration korreliert oder ob sich der renale Exkretionsmechanismus ändert in dem Sinne, daß die tubuläre Sekretion oder Reabsorption an Bedeutung gewinnen.

In der Klinik sind Situationen nicht selten, bei denen es zu akuten oder auch länger anhaltenden Änderungen der renalen Perfusion kommt. Nach einer Untersuchung von Halkin et al. 1975 könnte besonders bei der prärenalen Azotämie die tubuläre Reabsorption des Digoxin eine bedeutende Rolle spielen. Experimentelle Studien über eine Änderung der renalen Perfusion mit daraus resultierender Änderung der glomerulären Filtration und des Urinflusses liegen nicht vor. Wir haben deshalb den renalen Exkretionsmechanismus von Digoxin bei akut und chronisch digitalisierten Hunden unter erheblich reduziertem renal-arteriellem Perfusionsdruck untersucht.

5.1. Versuchsanordnung.

Die Versuche wurden an 10 anästhesierten Hunden beiderlei Geschlechts vorgenommen (Körpergewicht: 20 - 30 kg) entsprechend den Angaben in Kapitel 3.1. Zusätzlich wurde in beide Nierenarterien je ein Katheter mittels Punktion eingelegt, um den renal-arteriellen Blutdruck zu messen und Blutproben gewinnen zu können. Bei allen 10 Hunden wurde eine verstellbare Konstriktorklemme um eine Nierenarterie proximal zur Katheterspitze gelegt. Der Blutdruck in beiden Nierenarterien sowie in der Femoralarterie wurden zusammen mit der Ableitung II des

EKG's nach Einthoven während des gesamten Experimentes registriert. Die Drucke wurden mit Hilfe eines Statham P 23 db-Druckelementes aufgenommen und registriert.

Die erste Gruppe von 5 Hunden erhielt 12 α -^{3}H-Digoxin während der Studie als Dauerinfusion in einer Dosis von 0,03 mg/kg/Std. (Schema Tab. 12). Dazu wurde Digoxin (Lanoxin, Burroughs Wellcome) mit physiologischer Kochsalzlösung und 12 α -^{3}H-Digoxin (spezifische Aktivität 18 mCi/mg, NEN Boston) bis zu einer spezifischen Aktivität von 133 µCi/mg verdünnt.

Die zweite Gruppe von 5 Hunden erhielt 0,03 mg/kg 12 α-^{3}H-Digoxin verdünnt auf die gleiche spezifische Aktivität täglich während 5 Tagen vor dem Experiment als einmalige intravenöse Gabe. Um eine konstante Serumkonzentration zu erreichen, erhielt die zweite Gruppe eine konstante Infusion von 1/24 der täglichen Digoxindosis pro Stunde während des Experimentes. Um einen Vergleich der renalen Exkretion des Digoxins mit dem Glomerulusfiltrat zu ermöglichen, infundierten wir 15 µCi ^{14}C-markiertes Inulin (spezifische Aktivität 2,16 µCi/g (NEN Boston)) nach einer anfänglichen Bolusinjektion von 0,5 µCi/kg.

Nach einer Verteilungsphase von einer Stunde untersuchten wir während vier 15 Minuten-Perioden die Normalwerte für die Hunde, wie in Kapitel 4 beschrieben. Aus der ersten Blutprobe wurde jeweils ein Hämatokrit bestimmt. In der akut digitalisierten Gruppe lag er mit 39,9 ± 3,3% ebenso wie in der chronisch digitalisierten mit 40,8 ± 2,2% innerhalb der Norm. Während der fünften 15-Minuten-Periode wurde der mittlere arterielle Blutdruck in einer Nierenarterie auf 67% der Norm gesenkt, indem das Gefäß proximal konstringiert wurde.

Bei vorausgehenden Experimenten untersuchten wir, wie groß die Reduktion des mittleren renal-arteriellen Blutdruckes sein mußte, um einen ausreichenden Urinfluß zur Messung der Digoxin- und Inulin-Clearance zu erhalten.

Digitalisierung :	Akut	Chronisch
Digoxin :	12α ^{3}H-markiert 0,03 mg / kg / h als Infusion	12α ^{3}H-markiert 0,03 mg / kg täglich i.v. während 5 Tagen und 1/24 der Tagesdosis pro Stunde als Infusion
Inulin :	1/2 µCi / kg ^{14}C-Inulin als Bolusinjektion 15 µCi / h als Infusion	
Versuchsablauf :	1 Stunde bis zum steady state	

Clearanceperiode 15 Minuten		
	1	normale Kreislaufverhältnisse
	2	
	3	
	4	
	5	renal arterielle Konstriktion
	6	Erholungsphase
	7	renal arterielle Konstriktion
	8	Erholungsphase

Tab. 12: Versuchsanordnung zur Messung der renalen Digoxin- und Inulin-Clearances vor und nach 33%iger Senkung des renal-arteriellen Perfusionsdruckes.

Dabei wurde die Inulin- und Digoxin-Clearance gemessen, nachdem der mittlere arterielle Blutdruck um 25, 33 und 50% gesenkt worden war. Eine Reduktion um 25% führte nicht zu einer wesentlichen Änderung des Glomerulusfiltrates. Eine Verminderung des Blutdruckes um 50% hatte in der Mehrzahl der Fälle ein Sistieren des Urinflusses zur Folge. Eine 33%ige Reduktion des renal-arteriellen Blutdruckes führte einmal zu einer erheblichen Verkleinerung des Glomerulusfiltrates, reduzierte den Urinfluß aber nur soweit, daß normale Clearance-Messungen möglich blieben.

Nach einer Erholungsphase von mindestens 15 Minuten engten wir dieselbe Nierenarterie wieder ein um den mittleren arteriellen Blutdruck auf 67% der Norm zu senken und wiederholten dies ein drittes Mal nach Normalisierung des Urinflusses. Im ganzen wurden 175 Clearancewerte für Inulin und Digoxin aus der Urin- und Serumradioaktivität errechnet, die im Doppelisotopenzählverfahren,wie in Kapitel 2 beschrieben, gemessen wurden.

Die Digoxinserumkonzentrationen wurden gleichzeitig radioimmunologisch nach der von uns beschriebenen Methode (Kapitel 2) gemessen.

5.2. Ergebnisse.

A. Akut digitalisierte Hunde.

Die Serum-Digoxinkonzentration stieg während des Versuches linear von 27,4 $\pm$ 4,0 ng/ml, nach 15 Min. auf 48,2 $\pm$ 8,5 ng/ml, nach 150 Min. der Dauerinfusion von 0,03 mg/kg/Std. Digoxin an (Abb. 4).

Die Konstriktion einer Nierenarterie führte bei diesen Tieren zu einem Abfall des mittleren renal-arteriellen Blutdruckes distal der Konstriktionsklemme von im Mittel

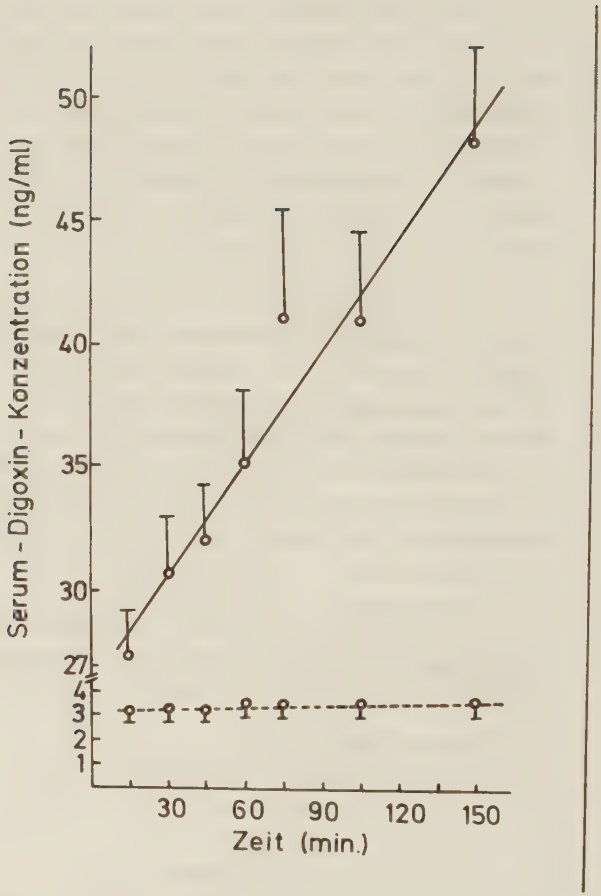

Abb. 4 : Serum-Digoxinkonzentrationen bei je 5 Hunden unter einer Dauerinfusion mit 0,03 mg/kg/Std. 12 α ^{3}H-Digoxin (——) und nach täglicher i.v. Injektion von 0,03 mg/kg 12 α ^{3}H-Digoxin (----) 5 Tage vor dem Experiment (letzte Injektion 24 Std. vor dem Experiment).

94 auf 62 mm Hg (Abb. 5). Der Urinfluß dieser Niere fiel erheblich von 0,9 auf 0,1 ml/min. ab, während der der kontralateralen Niere sich nicht wesentlich änderte (0,8 ± 0,2 und 1,2 ± 0,4 ml/min.).

Der Abfall des renal-arteriellen Blutdruckes führte zu einem Abfall des Glomerulusfiltrates, gemessen als Inulin-Clearance von im Mittel 23,0 auf 3,3 ml/min. Die Digoxin-Clearance fiel gleichzeitig von 16,6 auf 2,5 ml/min. ab (Abb. 5).

B. Chronisch digitalisierte Tiere.

In der Gruppe der chronisch digitalisierten Hunde wurde die Serum-Digoxinkonzentration während des gesamten Experimentes konstant zwischen 3,2 und 3,5 ng/ml gemessen (Abb. 4).

Der renal-arterielle Blutdruck wurde in einer Nierenarterie von 91 mm Hg auf 59 mm Hg distal der Konstriktionsklemme gesenkt (Abb. 8). Dies resultierte in einer Abnahme des Urinflusses dieser Niere von 1,3 auf 0,2 ml/min., während der Urinfluß der kontralateralen Niere sich nicht signifikant änderte (1,3 ± 0,7 und 0,9 ± 0,2 ml/min.).

Die Senkung des renal-arteriellen Blutdruckes auf 67% der Norm führte zu einem Abfall der Inulin-Clearance von im Mittel 23,7 auf 9,1 ml/min. Die Digoxin-Clearance fiel gleichzeitig von 19,6 auf 6,4 ml/min. ab (Abb. 6).

Die Daten wurden unter dem Gesichtspunkt des renalen Exkretionsmechanismus ausgewertet. Dazu diente das Verhältnis von Digoxin- zu Inulin-Clearance. Wie in der Tabelle 13 zu ersehen, änderte sich in der Gruppe der akut digitalisierten Hunde das Verhältnis von Digoxin- zu Inulin-Clearance vor und nach renal-arterieller Konstriktion nicht signifikant (0,72 bzw. 0,71). Das Verhältnis von Digoxin- zu Inulin-Clearance der

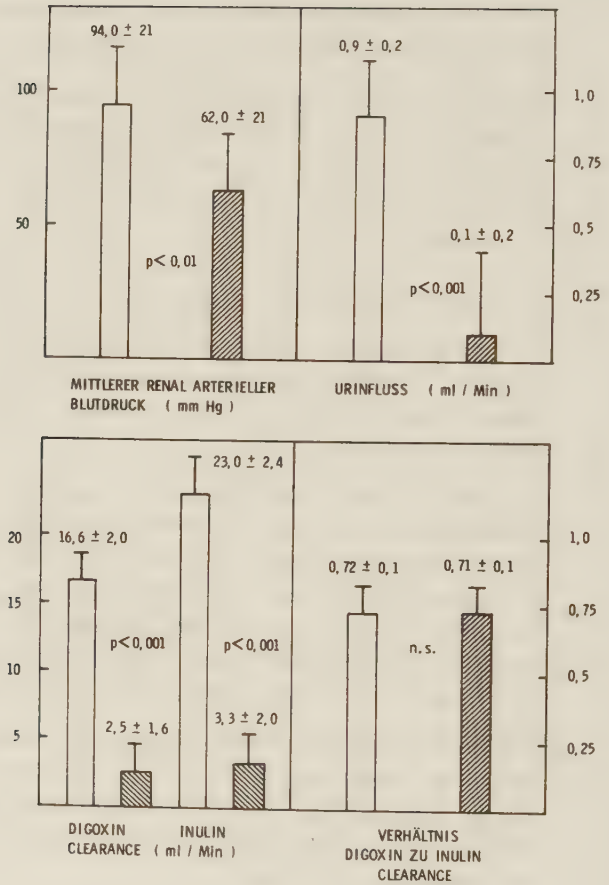

Abb. 5: Mittlerer renal-arterieller Blutdruck, Urinfluß, Digoxin-Clearance, Inulin-Clearance sowie das Verhältnis von Digoxin- zu Inulin-Clearance bei 5 Hunden, die 0,03 mg/kg/Std. 12 α ^{3}H-Digoxin als Dauerinfusion erhalten hatten, vor und während Senkung des renal-arteriellen Perfusionsdruckes um 33%.

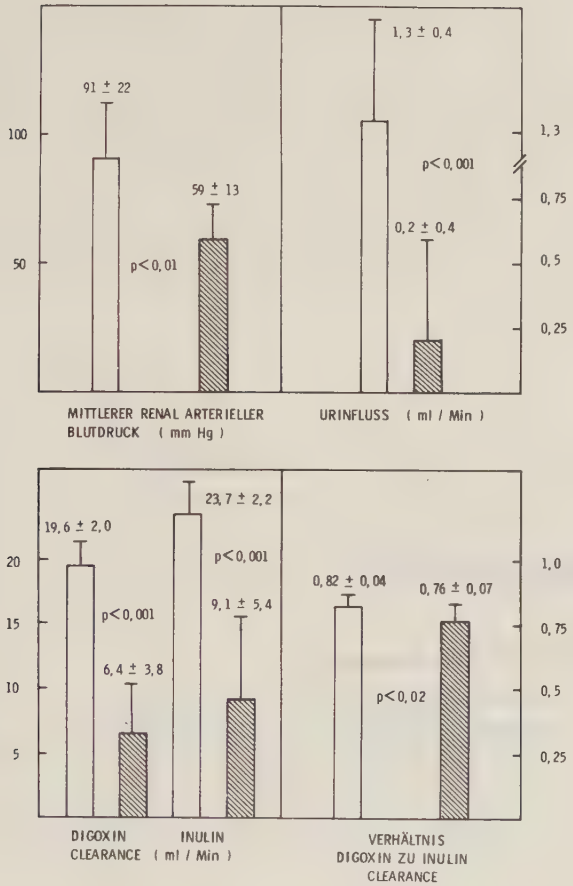

Abb.6 : Mittlerer renal-arterieller Blutdruck, Urinfluß, Digoxin-Clearance, Inulin-Clearance sowie das Verhältnis von Digoxin- zu Inulin-Clearance bei 5 Hunden, die 0,03 mg/kg 12 α ^{3}H-Digoxin täglich für 5 Tage vor dem Versuch erhalten hatten, vor und während Senkung des renal-arteriellen Perfusionsdruckes um 33%.

	Verhältnis von Digoxin- und Inulinclearance	
	Akute Digitalisierung	Chronische Digitalisierung
Vor Konstriktion der Nierenarterie	0,72 ± 0,12	0,82 ± 0,04
Während Konstriktion der Nierenarterie		
a) gedrosselte Niere	0,71 ± 0,10	0,76 ± 0,07
b) nicht gedrosselte Niere	0,75 ± 0,08	0,82 ± 0,09

Tab. 13: Das Verhältnis von Digoxin- zu Inulin-Clearance als Ausdruck des renalen Eliminationsmechanismus von Digoxin vor und während der Konstriktion einer Nierenarterie, um den renal-arteriellen Perfusionsdruck um 33% zu senken bei jeweils 5 Hunden, denen Digoxin akut bzw. chronisch verabreicht wurde.

kontralateralen nicht konstringierten Niere wurde mit 0,75 nicht signifikant verschieden gefunden.

In der Gruppe der chronisch digitalisierten Hunde errechneten wir ein Verhältnis von Digoxin- zu Inulin-Clearance von 0,82 vor Konstriktion, das sich auf 0,76 nach Reduktion des renal-arteriellen Blutdruckes signifikant ($P < 0{,}011$) verminderte. Das Digoxin- zu Inulin-Clearance-Verhältnis der kontralateralen Niere blieb unverändert 0,82.

5.3. Diskussion.

Die Elimination von Digoxin bei akuter Einschränkung der Nierenfunktion ist weniger gut untersucht. Halkin et al. 1975 berichten von 41 Patienten, deren Nierenfunktion durch eine Herzinsuffizienz eingeschränkt gefunden worden war. Die Untersucher konnten zeigen, daß die renale Digoxin-Clearance weit besser mit der Harnstoff-Clearance und dem Urinfluß korrelierte, als mit der Kreatinin-Clearance. Sie schlossen daraus, daß Digoxin in diesen Fällen zu einem entscheidenden Teil tubulär absorbiert wird. Unsere Untersuchungen waren angelegt, den Einfluß von Änderungen des renal-arteriellen Perfusionsdruckes, der glomerulären Filtration und des Urinflusses auf den Exkretionsmechanismus von Digoxin im Tierversuch näher zu charakterisieren. Wir untersuchten zwei Gruppen à 5 Hunde, die akut und chronisch digitalisiert waren, wobei jedes Tier als seine eigene Kontrolle diente. Bei allen Tieren hatte die Senkung des renal-arteriellen Perfusionsdruckes auf 67% der Norm eine erhebliche Auswirkung auf das Glomerulusfiltrat und den Urinfluß, die im Mittel um 62% bzw. 85% absanken. Bei allen Experimenten korrelierte der Abfall der Digoxin-Clearance mit der des Glomerulusfiltrates gemessen als Inulin-Clearance.

Benutzt man das Verhältnis von Digoxin- zu Inulin-Clearance als Anhalt für den renalen Exkretionsmechanismus, so wäre bei ausschließlicher glomerulärer Filtration ein Verhältnis von 0,8 zu erwarten, da Digoxin beim Hund wie auch beim Menschen im Gegensatz zum Inulin zu ca. 20% an Serumproteine gebunden ist. Ein Verhältnis von Digoxin- zu Inulin-Clearance von weniger als 0,8 würde für eine zusätzliche tubuläre Reabsorption, eine von mehr als 0,8 für eine zusätzliche tubuläre Sekretion sprechen. Das Verhältnis von Digoxin- zu Inulin-Clearance änderte sich in der chronisch digitalisierten Gruppe von 0,82 vor auf 0,76 nach Senkung des renal-arteriellen Perfusionsdruckes. Obwohl dieser Unterschied statistisch signifikant ist und für eine wenn auch geringe zusätzliche tubuläre Reabsorption bei vermindertem renal-arteriellen Perfusionsdruck spricht, so ist er doch praktisch ohne Bedeutung. In der Gruppe der akut digitalisierten Tiere änderte sich das Verhältnis von Digoxin- zu Inulin-Clearance nach Senkung des renal-arteriellen Perfusionsdruckes nicht.

Unsere Untersuchungen zeigen, daß eine erhebliche Senkung des renal-arteriellen Perfusionsdruckes mit deutlicher Abnahme des Glomerulusfiltrates und des Urinflusses keinen wesentlichen Einfluß auf den Exkretionsmechanismus des Digoxins hat.

Obwohl diese Versuchsanordnung nur bedingt auf die Klinik zu übertragen ist, so gibt sie doch Hinweise dafür, daß das Glomerulusfiltrat auch bei prärenaler Einschränkung der Nierenfunktion ein Maßstab für die Digoxin-Elimination darstellt. Da aber z.B. nach kardiochirurgischen Eingriffen die Pumpleistung des Herzens großen Schwankungen unterworfen ist, die nach Untersuchungen von Kawada et al. 1976 zu sehr raschen Kreatinin-Clearance-Änderungen führen, ist eine Dosisanpassung an die Nierenfunktion nur schwer möglich.

Keinen Aufschluß geben diese Untersuchungen über den renalen Exkretionsmechanismus von Digoxin bei akutem Nierenversagen mit tubulärer Nekrose. Die renale Elimination des Digoxins bei akutem Nierenversagen und einer Kreatinin-Clearance von unter 5 ml/min. ist mit dem bei chronisch niereninsuffizienten Patienten mit gleicher Einschränkung der Nierenfunktion vergleichbar. Dafür spricht, daß wir bei 4 Patienten (Kreatinin-Clearance kleiner als 5 ml/min.),die unter einem akuten Nierenversagen litten, bei einer Dauerdosis mit 0,1 mg ß-Acetyldigoxin täglich Serum-Digoxinkonzentrationen im therapeutischen Bereich fanden. Diese Kasuistik ist jedoch nur ein Anhalt. Unbekannt ist der Verteilungsraum des Digoxins bei akuter Niereninsuffizienz nicht nur während der Phase der Oligoanurie, sondern besonders auch während der Erholungsphase. Weitere Untersuchungen sind notwendig um zu klären, inwieweit auch während der Normalisierung der Nierenfunktion das Glomerulusfiltrat mit der Elimination des Digoxins korreliert.

6. Interaktion von Digoxin und anderen Arzneimitteln bei renaler Elimination.

Pharmaka, die zur Langzeittherapie eingesetzt werden, wie die Digitalisglykoside, werden häufig zusammen mit anderen Arzneimitteln, wie z.B. Diuretika oder Antiarrhythmika, verabreicht. Große Anstrengungen werden zur Zeit unternommen herauszufinden, welche Arzneimittel sich in ihrer Wirkung oder ihrem Stoffwechsel gegenseitig beeinflussen. Da die renale Ausscheidung für die Therapie mit Digoxin erhebliche Bedeutung hat, sind Interaktionen von Digoxin und anderen Arzneimitteln an der Niere von großer praktischer Bedeutung.

Die potentielle Gefahr einer Kombinationstherapie von Digitalisglykosiden und Chinidin bzw. Chinin wurde erst-

mals von Davis und Sprague 1929 vermutet. Gold et al. warnten 1932 vor der gleichzeitigen Gabe von Chinidin und Digitalisglykosiden. Über Digoxinserumspiegel im toxischen Bereich bei regelrechter Dosierung und gleichzeitiger Einnahme von Chinidin wurde erst in den letzten Jahren berichtet (Cohen 1977, Doering et al. 1978, 1979, Ejvinsson 1978, Hooymans et al. 1978, Leahey et al. 1978, Reiffel et al. 1978, 1979). Hooymans und Merkus 1978 diskutierten erstmals die Möglichkeit einer Beeinflussung der renalen Digoxin-Elimination durch Chinidin.

6.1. Eigene Untersuchungen.

11 männliche gesunde Probanden, Ärzte oder Medizinstudenten, die über mögliche Nebenwirkungen der Kombinationsmedikation aufgeklärt worden waren und ihr Einverständnis zu den Untersuchungen gegeben hatten, erhielten wie folgt Digoxin (Lanicor, Fa. Boehringer, Mannheim) (Abb. 7):
1. bis 3. Tag 0,75 mg, ab 4. Tag während der gesamten Versuchsdauer von 22 Tagen 0,375 mg Digoxin täglich per os. Vom 9. bis 15. Tag erhielten die Probanden zusätzlich 500 mg Chinidinbisulfat (Optochinidin retard, Fa. Boehringer, Mannheim) in zwei Dosen morgens und abends, ab 16. Tag 1000 mg Chinidinbisulfat, ebenfalls in zwei Tagesdosen bis zum 22. Tag. Kein Proband nahm andere Pharmaka ein.

Serum-Digoxinkonzentrationen wurden am 7., 8., 14., 15., 21. und 22. Tag bestimmt. Die endogene Kreatinin-Clearance, bezogen auf 1,73 m^2 Körperoberfläche, und die renale Digoxin-Clearance wurden mittels 12-stündiger Harnsammelperiode am 7., 8., 14., 15., 21. und 22. Tag bestimmt. Die Harnsammelperiode wurde jeweils 8 Stunden nach oraler Digoxingabe begonnen und auf 12 Stunden beschränkt, damit Serum- und Urinkonzentration während der Clearanceperiode geringen Schwankungen unterworfen waren. Für die Clearance-Berechnung wurde die zu

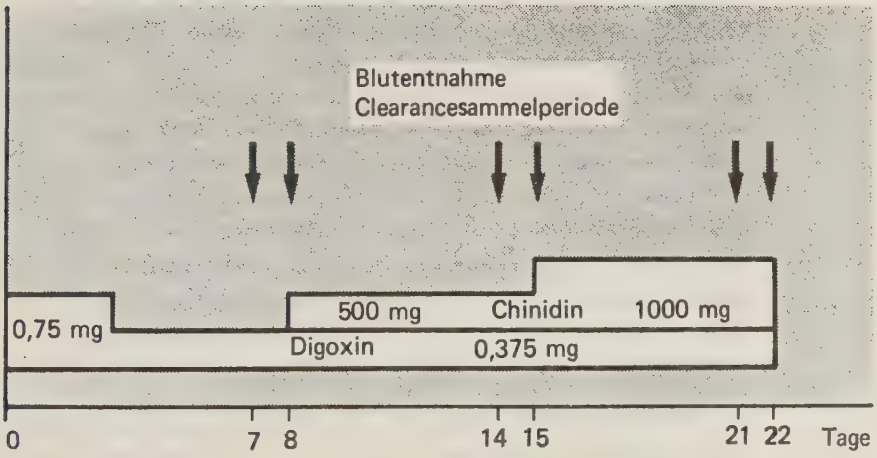

Abb. 7: Versuchsaufbau der Untersuchung von 11 Probanden zur Interaktion von Digoxin und Chinidin (Risler et al. 1979)

Anfang der 12 Stunden Harnsammelperiode gemessene Serumkonzentration eingesetzt. Am 14., 15., 21. und 22. Tag wurde die Chinidin-Serumkonzentration ebenfalls 8 Stunden nach Einnahme bestimmt.

6.2. Ergebnisse.

Bei den 11 Probanden änderten sich während der Untersuchungsperiode Laborwerte, wie Natrium, Kalium, Calcium, Kreatinin im Serum nicht signifikant. Die Serum-Digoxinkonzentrationen wurden nach einer Woche und Erreichen des steady state unter einer per oralen Digoxindosis von 0,375 mg mit 0,75 $\pm$ 0,2 ng/ml gemessen. Nach 8-tägiger gleichzeitiger Einnahme von 500 mg Chinidin stieg die Serum-Digoxinkonzentration auf 1,3 $\pm$ 0,4 ng/ml an. Die Chinidin-Serumkonzentration betrug 0,9 $\pm$ 0,3 µg/ml. Nach Erhöhung der Chinidindosis auf 1000 mg/die stieg der Serumdigoxinspiegel signifikant auf 1,8 $\pm$ 0,6 ng/ml an (Tab. 14). Bei 4 Probanden lag der Serumdigoxinspiegel über 2,0 ng/ml. Die Chinidin-Serumkonzentration unter einer per oralen Chinidindosis von 1000 mg betrug 1,6 $\pm$ 0,5 µg/ml. Sie lag signifikant ($p < 0{,}001$) höher als bei einer Dosis von 500 mg (Tab. 16).

Bei den Probanden wurde vor der Chinidingabe eine endogene Kreatinin-Clearance von 149,1 $\pm$ 57,5 ml/min./1,73 m^2 gemessen. Unter der gleichzeitigen Chinidindosis von 500 mg und 1000 mg/die änderten sich die Kreatinin-Clearancewerte nicht signifikant (Tab. 15). Die Digoxin-Clearance betrug bei den 11 Probanden vor der Chinidindodis im Mittel 186,2 $\pm$ 67,4 ml/min. und fiel unter einer Chinidindosis von 500 mg signifikant ($p < 0{,}04$) auf 125,4 $\pm$ 61,8 ml/min. ab. Unter der höheren Dosierung von 1000 mg Chinidin/die kam es zu keiner weiteren Änderung der Digoxin-Clearance (Tab. 15). Alle Serumkonzentrationen und Clearancewerte stellen

Versuchsperiode	I	II		III	
Probanden	Digoxin i. S. (ng/ml)	Digoxin i. S. (ng/ml)	Chinidin i. S. (µg/ml)	Digoxin i. S. (ng/ml)	Chinidin i. S. (µg/ml)
1	1,1	1,8	1,5	1,9	2,2
2	0,8	1,2	1,1	1,7	1,1
3	0,9	1,4	0,6	2,1	0,9
4	0,9	1,3	0,8	2,0	1,0
5	0,7	1,7	0,7	2,4	2,4
6	0,7	1,8	0,9	3,0	2,0
7	0,7	1,7	0,8	2,1	1,5
8	0,7	1,5	0,8	1,8	1,3
9	0,4	0,8	0,8	1,0	1,7
10	0,7	0,7	1,0	1,3	1,7
11	0,6	0,9	0,4	1,0	1,3
	0,8 ± 0,2	1,3 ± 0,4	0,9 ± 0,3	1,8 ± 0,6	1,6 ± 0,5

$p < 0,0001$ $p < 0,001$ $p < 0,001$

Tab. 14: Serum-Digoxinkonzentrationen vor (Versuchsperiode I) und Serumdigoxin- und -chinidinkonzentrationen nach gleichzeitiger Einnahme von 0,375 mg Digoxin und 500 mg Chinidin (Versuchsperiode II) bzw. 1000 mg Chinidin (Versuchsperiode III) (Risler et al. 1979).

Versuchsperiode	I		II		III	
Probanten	Digoxinclear. (ml/min)	Kreatininclear. (ml/min)	Digoxinclear. (ml/min)	Kreatininclear. (ml/min)	Digoxinclear. (ml/min)	Kreatininclear. (ml/min)
1	90,6	112,9	102,2	83,3	88,5	89,7
2	98,7	118,3	108,3	129,3	78,9	119,5
3	135,1	130,1	125,5	116,2	88,1	124,7
4	147,8	108,4	130,8	103,8	82,7	142,3
5	208,7	111,0	84,4	126,5	98,6	105,0
6	189,5	104,2	74,4	102,0	101,9	104,2
7	195,6	113,6	93,8	146,8	117,5	152,0
8	191,9	147,5	79,1	115,6	134,0	139,8
9	272,1	202,6	206,6	200,7	173,3	145,7
10	204,6	211,4	98,5	156,0	109,9	140,7
11	313,5	280,6	275,6	270,3	253,1	219,6
	186,2 ± 67,4	149 ± 57,5	125,4 ± 61,8	141,0 ± 53,3	120,6 ± 51,7	134,8 ± 34,5
	p < 0,02		n.s.		n.s.	
	p < 0,004		n.s.			
	n.s.		n.s.			

Tab. 15: Digoxin- und Kreatinin-Clearances vor (Versuchsperiode I) und nach gleichzeitiger Gabe von 0,375 mg Digoxin und 500 mg Chinidin (Versuchsperiode II) bzw. 1000 mg Chinidin (Versuchsperiode III) (Risler et al. 1979).

Mittel aus Messungen an zwei aufeinander folgenden Tagen dar (7. und 8. Tag Phase I; 14. und 15. Tag Phase II; 21. und 22. Tag Phase III).

6.3. Diskussion.

Die Nebenwirkungen einer Kombinationstherapie von Digitalisglykosiden und Chinidin sind seit langer Zeit bekannt. Erst nahezu 10 Jahre nach Einführung der radioimmunologischen Digoxinbestimmung im Serum wurden die ersten Beobachtungen mitgeteilt, daß die Serum-Digoxinkonzentration bei gleichzeitiger Gabe von Chinidin erhöht sein kann (Doering et al. 1978, Ejvinsson 1978, Hooymans et al. 1978, Leahey et al. 1978, Reiffel et al. 1978, 1979).

Unsere Untersuchungen an Probanden zeigen, daß es unter einer therapeutischen Dosis von 500 mg Chinidin/die und einer Erhaltungsdosis von 0,375 mg Digoxin zu einem signifikanten Anstieg des Serumdigoxinspiegels kommt. Der mittlere Digoxinserumspiegel stieg von 0,8 auf 1,3 ng/ml an. Nach Erhöhung der Chinidindosis auf 1000 mg/die lagen bei einzelnen Probanden die Serumdigoxinspiegel im sogen. toxischen Bereich. Klinisch wurden bei den Probanden in einem Fall eine Diarrhoe sowie in 3 Fällen eine Apathie beobachtet. Herzrhythmusstörungen traten während der gesamten Versuchsdauer nicht auf.

Gleichzeitig konnten wir zeigen, daß, wenn gleichzeitig 500 mg Chinidinsulfat täglich verabreicht werden, die renale Ausscheidung des Digoxins signifikant absinkt. Die Digoxin-Clearance fiel von 186,2 auf 125,4 im Mittel signifikant ab, während die endogene Kreatinin-Clearance als Ausdruck gleichbleibender Nierenfunktion während der gesamten Zeit gleich blieb. Damit wird die Vermutung von Hooymans und Merkus 1978, daß Chinidin die renale Clearance von Digoxin beeinflussen könnte,

erhärtet. Vergleicht man das Verhältnis von Digoxin- zu Kreatinin-Clearance vor und während gleichzeitiger Chinidintherapie, so fällt ein Absinken von 1,25 auf 0,90 auf. Der Abfall der Digoxin-Clearance auf das Niveau des Glomerulusfiltrates könnte bedeuten, daß die tubuläre Sekretion des Digoxins gehemmt wird. Die Abnahme der Digoxin-Clearance um ca. 1/3 liegt in der gleichen Größenordnung, wie sie Steiness 1974 und Waldorf et al. 1978 bei gleichzeitiger Gabe von Spironolactone beobachteten.

Die Annahme ist naheliegend, daß Chinidin die renale Clearance von Digoxin um den Anteil zu senken vermag, der einer tubulären Sekretion des Digoxins entsprechen könnte.

Die Behinderung der renalen Elimination von Digoxin durch Chinidin stellt u.E. eine plausible Erklärung für die erhöht gefundenen Serumdigoxinspiegel dar. Das weitere Ansteigen unter einer Erhöhung der Chinidindosis auf 1000 mg/die bei gleichbleibender Digoxin-Clearance weist jedoch darauf hin, daß zusätzliche Mechanismen eine Rolle spielen. Hierbei sind die Veränderungen der Bioverfügbarkeit des Digoxins ebenso wie die Veränderung des Verteilungsraumes in Betracht zu ziehen. Straub et al. 1978 wiesen darauf hin, daß eine Verdrängung des Digoxins vom Rezeptor der Na^+-K^+-ATPase durch das Chinidin möglich ist, ein Befund, der von Doering 1979 nicht bestätigt wurde. Ein Anhalt für den zugrunde liegenden Mechanismus gibt die Arbeit von Hager et al. 1979, die bei 6 Probanden bei gleichzeitiger Digoxin- und Chinidineinnahme eine Abnahme des Verteilungsraumes von Digoxin fanden. Eine Änderung der Bioverfügbarkeit von Digoxin durch Chinidin erscheint nach unseren Untersuchungen, insbesondere aufgrund der eingeschränkten renalen Elimination unter Chinidin,eher unwahrscheinlich, läßt sich aber nicht ausschließen. Welchen Anteil eine Änderung des Verteilungsraumes oder der extrarenalen Clearance für Digoxin

an der Erhöhung der Serum-Digoxinspiegel haben, ist zur Zeit unbekannt.

Nach Untersuchungen von Kaufmann 1978 ist ein anderes Antiarrhythmikum Amiodarone in der Lage, die Serum-Digoxinkonzentration zu erhöhen. Der Autor vermutet aufgrund von Untersuchungen von Burger et al. 1976, daß Amiodarone die Schilddrüsenfunktion hemmt und so bewirkt, daß das Glomerulusfiltrat absinkt.

Die tubuläre Reabsorption spielt beim Menschen keine wesentliche Rolle bei der renalen Elimination von Digoxin. Dafür spricht das Fehlen einer Interaktion zwischen Digoxin und Diuretika. Nach Arbeiten von Sempler 1975, McAllister et al. 1976, Malcolm et al. 1977, Brown et al. 1977 hat Furosemid keinen Einfluß auf die Ausscheidung von Digoxin. Nach Arbeiten von Bisset et al. 1972, die die renale Digoxinausscheidung bei Patienten mit Diabetes insipidus messen konnten, hat der Urinfluß keinen Einfluß auf die Digoxinausscheidung. Diese Beobachtungen werden unterstützt durch die Untersuchungen von Pall et al. 1974, die auch unter forcierter Diurese keine Zunahme der Digoxin-Clearance fanden.

Nur wenige Berichte über Interaktionen von Pharmaka bei der renalen Ausscheidung von ß-Acetyldigoxin, ß-Methyl- und α -Acetyldigoxin sind in der Literatur. Da ß-Acetyldigoxin bereits in der Darmwand seine Acetylgruppe verliert und lediglich Digoxin in den Nierenkreislauf gelangt, sind Interaktionen mit Pharmaka wie bei Digoxin zu erwarten.

ß-Methyldigoxin ist im Serum nach oraler und intravenöser Gabe als Mischung von ß-Methyldigoxin und Digoxin gefunden worden. Wie oben dargestellt, wird die renale Clearance dieser Substanzen, die nicht radioimmunologisch unterschieden werden können, kleiner als die des Digoxin gemessen. Während für das unveränderte Digoxin die Mög-

lichkeiten der Interaktion mit den oben beschriebenen Pharmaka anzunehmen ist, ist unbekannt, ob andere Pharmaka auf die Ausscheidung des wesentlich lipophileren ß-Methyldigoxin Einfluß nehmen können. Furosemid ist nach den Studien von Baczynski et al. 1978 ebensowenig in der Lage, die Ausscheidung von ß-Methyldigoxin zu beeinflussen, wie die des unveränderten Digoxins. Nach einer Arbeit von Doering 1979 unterliegt ß-Methyldigoxin der gleichen Interaktion mit Chinidin wie Digoxin.

Für α-Acetyldigoxin, das allerdings zum größten Teil in Form des unveränderten Digoxins ausgeschlossen wird, sind bisher keine Studien zur Interaktion mit anderen Pharmaka bekannt.

7. Die extrakorporale Elimination von Digoxin.

Mit den allgemein zugänglichen therapeutischen Möglichkeiten kann die Elimination von Digoxin nicht meßbar beschleunigt werden. Seit mehr als 10 Jahren wird die Peritonealdialyse sowie die extrakorporale Hämodialyse routinemäßig eingesetzt, einmal zur Behandlung von niereninsuffizienten Patienten, aber auch zur Behandlung schwerster Intoxikationen.
Nach Arbeiten von Schreiner et al. 1970 ist die Hämodialyse zur Behandlung von Vergiftungen durch Pharmaka geeignet, deren Molekülgröße klein ist, deren Serumproteinbindung gering ist und deren Verteilung im Organismus es erlaubt, größere Mengen aus dem Blut zu eliminieren. Seit 1975 werden zwei neue Methoden der extrakorporalen Gift-Elimination klinisch angewandt: Die Hämofiltration und die Hämoperfusion. Es soll hier untersucht werden, inwieweit diese Methoden in der Lage sind, Digoxin aus dem Organismus zu eliminieren. Dies ist in zweifacher Hinsicht von Bedeutung:

Sind diese Methoden zur Behandlung der Digoxin-Intoxikation geeignet?

Ist die Dosierung von Digoxin bei Patienten, die hämodialysiert werden, nicht nur an die Restfunktion der Niere, sondern an die vermehrte Elimination während der Hämodialyse anzupassen?

7.1. Versuchsanordnung.

A. Hämodialyse:

Untersucht wurde die Effektivität zweier Plattendialysatoren (Gambro Lundia Nova, Gambro Schweden, Membranoberfläche 1 m^2; Gambro Lundia Mayor, Membranoberfläche 1,5 m^2) und die eines Kapillardialysators (Asahi K 101,

Asahi Japan, Membranoberfläche 1 m^2). Das Dialysekonzentrat wurde automatisch von einer Dialysemaschine Braun K 66 (Braun-Fraba Köln) im Verhältnis 1 : 20 aus Weichwasser und einem Elektrolytkonzentrat hergestellt. Das Dialysatgemisch enthielt 135 mval/l Natrium, 2,0 mval/l Kalium, 3,5 mval/l Calcium, 1,5 mval/l Magnesium sowie 105 mval/l Chlor. Jeweils 5 Patienten wurden während 5 Stunden venovenös dialysiert. Dabei wurde der extrakorporale Blutfluß bei 200 ml/min. und der Dialysatfluß mit 500 ml/min. konstant gehalten.

Die Patienten erhielten Heparin als Dauerinfusion in einer Dosis, die eine Verlängerung der Plasmathrombinzeit auf das Doppelte garantierte.

Zur Analyse der Serum-Digoxinkonzentration vor und dann stündlich nach Beginn der Dialyse wurden gleichzeitig je 5 ccm Vollblut aus dem zu- und abführenden System der Hämodialyse entnommen.

Die Leistung der zu untersuchenden Dialysatoren Digoxin zu eliminieren, wurde abgeschätzt durch Berechnung der Clearance, die in diesem System gleich der Dialysance ist, da in einem Single pass System die Digoxinkonzentration in der Dialysatflüssigkeit gleich Null ist. Die Clearance einer Substanz entspricht dem Produkt aus Blutfluß f (ml/min.) durch das extrakorporale System und der arteriovenösen Serum-Konzentrationsdifferenz A -V (ng/ml) dividiert durch die Serumkonzentration im arteriellen Schenkel A (ng/ml) des extrakorporalen Kreislaufs.

$$C = \frac{f\ (A - V)}{A} \quad \text{ml/min.}$$

B. Hämofiltration:

Die Effektivität der Elimination von Digoxin durch die Hämofiltration wurde mit Hilfe des Hämoprozessors (Fa. Fresenius, Bad Homburg) untersucht. Als Hämofilter diente ein Plattendialysator RP6 (Fa. Rhône-Poulenc), die eine Membranoberfläche von 1,03 m^2 aufweist. Die

Membran,eine Poliacrylonitril-Folie hat die Eigenschaften, Substanzen durchzulassen bis zu einem Molekulargewicht von ca. 40.000. Der Blutfluß im extrakorporalen Kreislauf wurde mit 200 ml/min. konstant gehalten. Unter dem transmembranösen Druck von 300 bis 500 mm Hg wurden insgesamt 20 l eines Ultrafiltrates während einer Behandlung abgepreßt. Als Volumenersatz wurde eine Elektrolytlösung der Fa. Fresenius, Bad Homburg in den abführenden Schenkel des extrakorporalen Kreislaufes infundiert (Zusammensetzung: Natrium 135 mval/l, Kalium 2,0 mval/l, Magnesium 1,5 mval/l, Calcium 3,5 mval/l, Chlor 101 mval/l). Jeweils zu Beginn und stündlich darauf wurden 5 ml Vollblut aus dem zuführenden Schenkel des extrakorporalen Kreislaufs entnommen. Aus dem Blutfluß, der Serum-Digoxinkonzentration und der eliminierten Digoxingesamtmenge, gemessen im Ultrafiltrat, wurde die Clearance wie folgt berechnet: Die Clearance (Cl) in ml/min. ist gleich dem Produkt aus Digoxinkonzentration im Ultrafiltrat (U) in ng/ml und dem Filtratvolumen (V) in ml/min., dividiert durch die Serumkonzentration im zuführenden Schenkel (P) in ng/ml des extrakorporalen Kreislaufs.

$$Cl = \frac{U \cdot V}{P} \text{ ml/min.}$$

C. Hämoperfusion:

Die Effektivität der Hämoperfusion in der Elimination von Digoxin wurde im Tierversuch und bei einer Patientin untersucht. Der extrakorporale Kreislauf der Hämoperfusion wurde an eine Femoralvene angeschlossen und zu der kontralateralen zurückgeführt. Das Blut wurde durch einen Polivenylschlauchsystem über eine Rollerpumpe zur Hämoperfusionskartusche und dann zurück zur Femoralvene geleitet. Der Blutdruck im extrakorporalen Kreislauf wurde vor und hinter der Hämoperfusionskartusche mittels eines geeichten Manometers gemessen.

Ein geeichtes Flowmeter zeigte kontinuierlich den Blutfluß im System an. Zur Überwachung des Kreislaufes der Versuchstiere wurde der Blutdruck in einer Femoralarterie mit Hilfe eines Statham-Druckwandlers gemessen. Die Ableitung II eines EKG's nach Einthoven wurde kontinuierlich registriert. Um eine Gerinnung im extrakorporalen Kreislauf, insbesondere in der Hämoperfusionskartusche zu verhindern, wurde die Plasmathrombinzeit mittels intermittierender Heparingabe auf das Dreifache der Norm verlängert.

Untersucht wurden drei verschieden im Handel befindliche Hämoperfusionskartuschen:

1. Hemocol Pediatric (Fa. Dr.Fresenius, Bad Homburg), Inhalt 130 g dextranbeschichtete Holzkohle.
2. Hemocol (Fa. Dr.Fresenius, Bad Homburg), Inhalt 300 g dextranbeschichtete Holzkohle.
3. Hemoresin (Fa. B.Braun, Melsungen), Inhalt 355 g Amberlite XAD4.

Der Blutfluß im extrakorporalen Kreislauf wurde auf 150 ml/min. eingestellt. Bei zwei Versuchen senkten wir die Blutflußgeschwindigkeit auf 100 ml/min., um deren Einfluß auf die Elimination beurteilen zu können. Die Behandlungsdauer wurde einheitlich auf 180 Min. festgelegt. Aus dem venösen und arteriellen Schenkel des extrakorporalen Kreislaufes wurden in 15-minütigem Abstand jeweils 5 ml Vollblut zur radioimmunologischen Digoxinkonzentrations-Bestimmung gewonnen.

Zur Abschätzung der Eliminationsleistung der verschiedenen gewählten Systeme wurden Digoxin-Clearances berechnet, die halbstündlich aus der arteriovenösen Differenz nach der Formel

$$Cl = \frac{f \cdot (A - V)}{A} \text{ ml/min.}$$

gemessen wurden, wobei f dem Blutfluß im extrakorporalen Kreislauf in ml/min., A der Digoxinkonzentration vor der Kartusche in ng/ml, V der hinter der Kartusche in ng/ml entsprechen.

Die Effektivität der Hämoperfusionsbehandlung über das Adsorberharz Amberlite XAD4 konnten wir bei einer Patientin messen, die wegen einer schweren Cabromal-Intoxikation dieser Behandlungsmethode unterzogen werden mußte. Sie erhielt zwischen der ersten Hämoperfusionsperiode und der wegen des schweren Vergiftungsbildes notwendigen zweiten 3 x 0,4 mg ß-Acetyldigoxin (Novodigal) i.v. Die letzte Gabe erfolgte 7 Stunden vor der erneuten Behandlung. Der Blutfluß während der 2-stündigen Hämoperfusion wurde mit 105 ml/min. im extrakorporalen Kreislauf konstant gehalten. Auch hier wurden in 15-minütigem Abstand Blutproben aus dem arteriellen und dem venösen Schenkel des extrakorporalen Kreislaufs entnommen und nach der oben angegebenen Methode auf die Digoxinkonzentration hin untersucht. Zur Abschätzung der Eliminationsleistung wurden, wie oben beschrieben, Digoxin-Clearances berechnet, die halbstündlich aus der arteriovenösen Differenz gemessen wurden.

7.2. Ergebnisse.

Hämodialyse: Bei 5 Patienten, die während 5 Stunden mit dem Plattendialysator Gambro Lundia Nova dialysiert wurden, wurde eine mittlere Digoxin-Clearance von 17 $\pm$ 10 ml/min. gemessen.

Bei 5 Patienten, die während 5 Stunden mit dem Plattendialysator Gambro Lundia Mayor dialysiert wurden, wurde eine mittlere Digoxin-Clearance von 30 $\pm$ 7 ml/min. gemessen.

Bei 5 Patienten, die während 5 Stunden mit der Kapillarniere Asahi K 101 dialysiert wurden, errechnete sich eine mittlere Digoxin-Clearance von 32 $\pm$ 19 ml/min.

Hämofiltration: Wesentlich effektiver war die Elimination des Digoxins während der Hämofiltrationsbehandlung. Die Clearance während der Behandlungsdauer von ca. 5 Stunden und einem Gesamtfiltrationsvolumen von 20 l wurde mit 60 ± 7 ml/min. gemessen.

Hämoperfusion: Je 3 Hunde wurden während 3 Stunden mit einer Kartusche hämoperfundiert, die 130 g bzw. 300 g dextranbeschichtete Holzkohle enthielt. Die gemessenen mittleren Digoxin-Clearances wurden mit 28 ± 9 bzw. 41 ± 16 ml/min. errechnet. Während der 3-stündigen Versuchsdauer fielen die gemessenen Clearances in beiden Gruppen deutlich ab (Abb. 8). Die Hämoperfusion über 300 g dextranbeschichtete Holzkohle war insbesondere während der ersten Minuten effektiver. Eine signifikant größere mittlere Clearance von 112 ± 15 ml/min. wurde gemessen bei der Hämoperfusion über 355 g Amberlite XAD4. Die Reduzierung der Blutflußgeschwindigkeit um 1/3 hatte eine Abnahme der Digoxin-Clearance von lediglich 1/4 zur Folge. Wie aus Abb. 8 hervorgeht, nahm die Effektivität der Hämoperfusionsbehandlung während der 180 Min. z.T. erheblich ab. Da die Clearance-Messungen nicht den Digoxin-Konzentrationsverlauf im Serum der Versuchstiere widerspiegelt, zeigen die Abbildungen 9 bis 11, die während der jeweiligen Clearance-Messungen im Serum bestimmten Digoxinkonzentration je eines Versuchstieres. Effektiv während der Behandlungszeit von je 3 Stunden eliminierte Menge an Digoxin läßt sich aus der Fläche zwischen den Serum-Konzentrationskurven, bestimmt aus dem Serum des zu- und abführenden Schenkels des extrakorporalen Kreislaufes, berechnen. Da die absolut eliminierte Menge Digoxin auch von dessen Konzentration im Serum abhängig ist, wurde zusätzlich in Tabelle 16 die Serumkonzentration zu Beginn und nach Abschluß der Hämoperfusion aufgetragen.

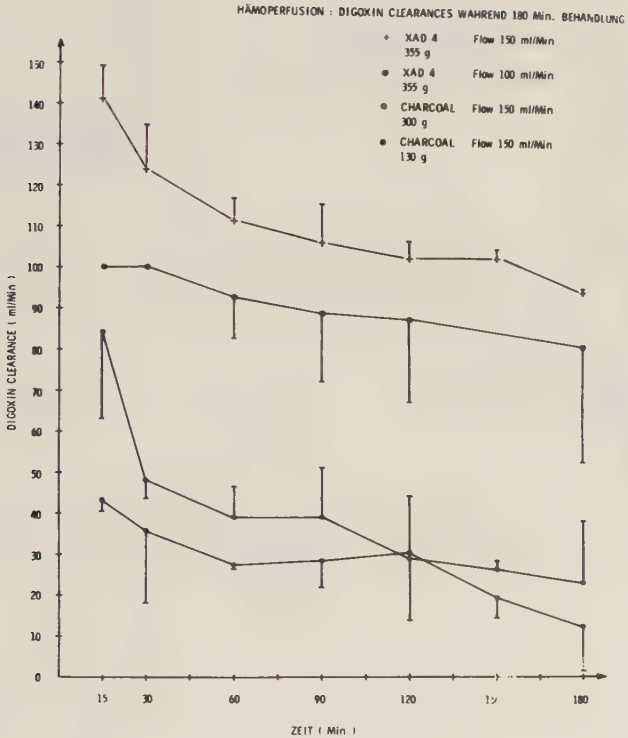

Abb. 8; Die mittleren Digoxin-Clearances, gemessen bei 12 Hunden während einer 3-stündigen Hämoperfusion über dextranbeschichtete Holzkohle bzw. Amberlite XAD4. (Risler et al. 1979)

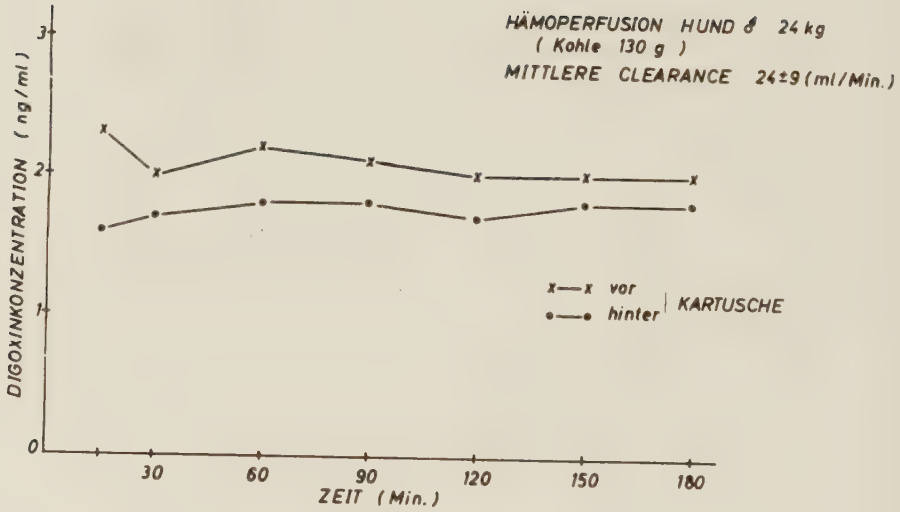

Abb. 9: Verlauf der Serum-Digoxinkonzentration während der Hämoperfusion über 130 g dextranbeschichtete Holzkohle (Risler et al. 1979).

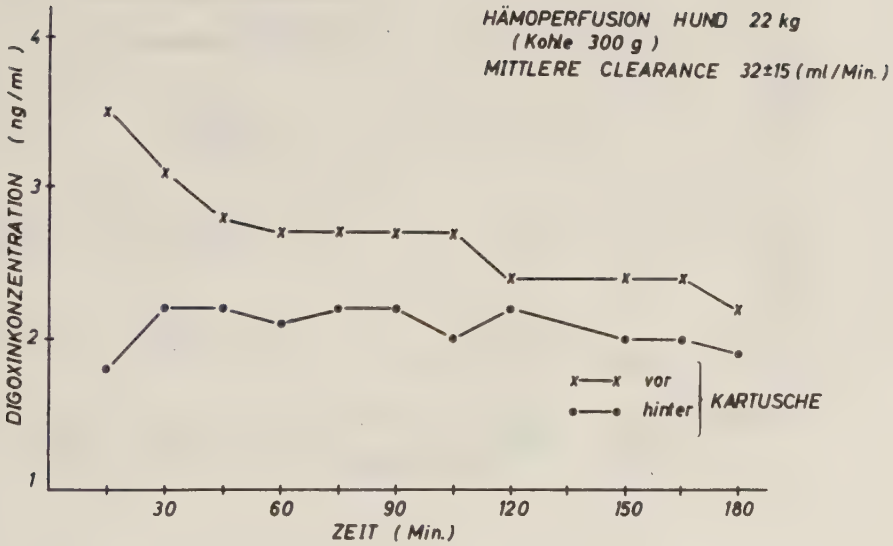

Abb. 10: Verlauf der Serum-Digoxinkonzentration während der Hämoperfusion über 300 g dextranbeschichtete Holzkohle (Risler et al. 1979).

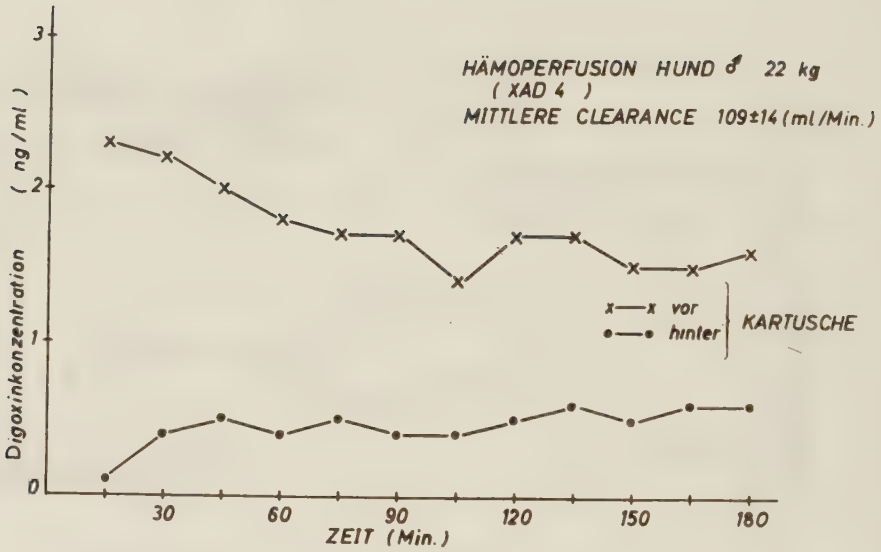

Abb. 11: Verlauf der Serum-Digoxinkonzentration während der Hömoperfusion über 355 g Amberlite XAD4 (Risler et al. 1979).

	Inhalt der Kartusche	Blutfluß (ml/Min)	Digoxinkonzentration vor / nach Hämoperfusion	Clearance (ml/Min)	Gesamtmenge eliminiert (ng/Behandlung)
Hemocol^{R} pediatric n=3	130 g dextranbeschichtete Holzkohle	100	2,0 ± 0,3 1,4 ± 0,7	28 ± 9	7726 ± 2280
Hemocol^{R} n=3	300 g dextranbeschichtete Holzkohle	100	2,4 ± 1,1 1,7 ± 0,9	40 ± 16	12938 ± 2840
Hemoresin^{R} n=4	Amberlite XAD4 355 g	100	5,7 ± 1,0 3,0 ± 1,4	87 ± 4	53223 ± 7265
Hemoresin^{R} n=2	—	150	2,6 ± 0,7 1,9 ± 0,5	112 ± 15	39803 ± 7605

Tab. 16: Vergleich der von uns untersuchten Methoden der Hämoperfusion, Digoxin aus dem Blut zu eliminieren, hinsichtlich der Clearances und der absolut eliminierten Digoxinmengen. (Risler et al. 1979)

Da die Proteinbindung des Digoxins bei Hund und Mensch zwischen 20 und 30% anzunehmen ist und zudem nach Weidler 1978 das Verteilungsvolumen ähnlich ist, ist die Effektivität der Behandlungsmethode im Tierversuch und der klinischen Anwendung vergleichbar.

Abbildung 14 zeigt den Digoxin-Serumkonzentrationsverlauf während der 2-stündigen Hämoperfusion,der sich die 25-jährige Patientin wegen einer schweren Cabromal-Intoxikation unterziehen mußte. Die mittlere Digoxin-Clearance von 84 $\pm$ 55 ml/min. wurde unter den gleichen Voraussetzungen (Blutfluß 150 ml/min., Kartusche Hemoresin) gemessen.

7.3. Diskussion.

Die Peritonealdialyse ist nicht in der Lage, größere Anteile des Gesamtkörperbestandes an Digoxin zu eliminieren. Nach Angaben von Ackermann et al. 1967 und Kramer et al. 1972 werden weniger als 3% einer verabreichten Dosis ^{3}H-Digoxin und 4,1% einer Dosis ^{3}H-ß-Methyldigoxin eliminiert. Die Unterschiede sind einmal auf methodische Differenzen, wie z.B. Zeit der Injektion der Testdosis vor oder während der Dialyse, Dauer der Dialyse, aber auch auf die unterschiedliche Lipoidlöslichkeit von Digoxin und ß-Methyldigoxin zurückzuführen, die die Durchlässigkeit dieser Substanzen durch die Peritonealmembran beeinflußt.

Die Hämodialyse ist in der Lage, größere Mengen von Digoxin aus dem Blut zu eliminieren. Ackermann et al. 1967, aber auch Bloom et al. 1966 konnten Dialysancewerte von 10 ml/min. für einen Kiil-Dialysator und einen Twin coil-Spulendialysator messen. Sie benutzten ebenso wie Kramer et al. 1972, der die Elimination von ß-Methyldigoxin untersuchte, Tritium-markierte Glykoside. Kramer konnte für einen großflächigen Spulendialysator eine Dialysance von 25 $\pm$ 6 ml/min. für ß-Methyldigoxin

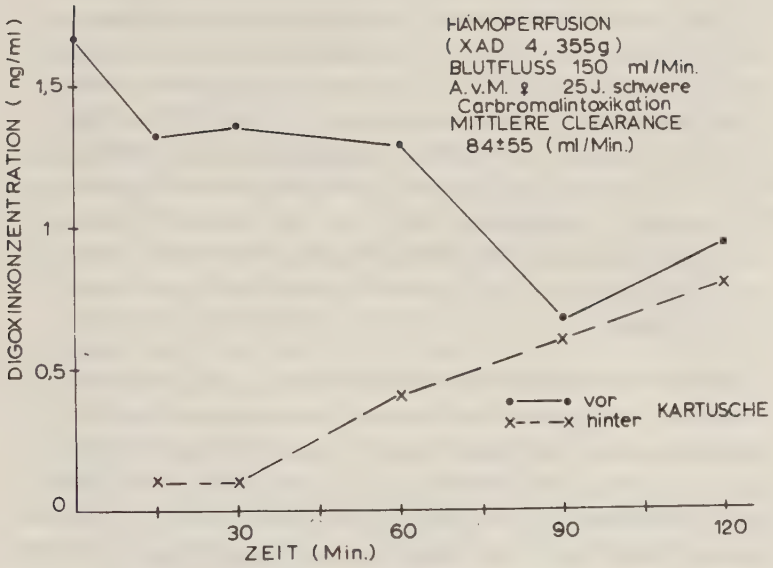

Abb. 12: Serum-Digoxinkonzentration, gemessen bei einer Patientin, die wegen einer schweren Bromcarbamid-Intoxikation hämoperfundiert wurde (Risler et al. 1979).

nachweisen. Iisalo et al. 1974 bestätigte diese Meßwerte durch Untersuchungen der Dialysance von Digoxin bei einem Spulendialysator. In dieser Untersuchung wurde die Digoxinkonzentration radioimmunologisch gemessen. Obwohl die modernen Dialysatoren technisch verbessert wurden (Single pass, größere Oberfläche), sind sie nach unseren Untersuchungen und den von van der Vijgh 1977 nicht in der Lage, die Elimination von Digoxin wesentlich zu erhöhen. Im Vergleich zur Eliminationsleistung der gesunden Nieren, für die wir eine mittlere Digoxin-Clearance von 109 $\pm$ 16 ml/min. messen konnten, ist die der Hämodialyse etwa 60% geringer. Da die Hämodialyse nur während 15 bis 20 Stunden pro Woche durchgeführt wird, ist der während dieser Zeit eliminierte Anteil des Digoxins so klein, daß eine Dosisangleichung bei Dialysepatienten nicht in Frage kommt.

Unterschiedlich ist die Meinung über die Effektivität der Hämodialyse bei der Behandlung der Digoxin-Intoxikation. Während Kramer et al. 1972 und Diekmann et al. 1976 eine Hämodialyse als mögliche therapeutische Maßnahme bei der Digoxin-Intoxikation in Betracht ziehen oder sogar anraten, halten Ackermann et al. 1967, Iisalo et al. 1974 sowie Holt et al. 1975 diese Methode für nicht effektiv genug.

Die Hämofiltration ist nach Arbeiten von Rumpf et al. 1978 und nach unseren Untersuchungen in der Lage, die Ausscheidung von Digoxin noch weiter zu steigern. Rumpf et al. errechneten eine mittlere Clearance von 36,7 ml/min. Wir konnten in unseren Untersuchungen eine Clearance von 60 $\pm$ 7 ml/min. zeigen.

Die wohl wirksamste Methode Digoxin aus dem Plasma zu eliminieren, ist die Hämoperfusion. So ist es möglich, mit der Hämoperfusion über dextranbeschichtete Holzkohle ca. 1/3 der Exkretionsleistung der normalen Niere zu erreichen, während die Ausscheidung von Digoxin mit

Hilfe des Adsorberharzes XAD4 der Eliminationsleistung einer menschlichen Niere, wenn auch nur während einer begrenzten Zeit nahekommt. Die Effektivität dieser Methode ist also deutlich höher als die der Hämodialyse, die auch mit modernsten Dialysatoren nicht wesentlich über 30 ml/min. anzunehmen ist. Die Ergebnisse sind mit den von Caravallo et al. 1975, Prichard et al. 1977 zu vergleichen. Gibson et al. 1978 fanden bei der Hämoperfusion des Adsorberharzes Amberlite XAD4 höhere Digoxin-Clearances, obwohl im Gegensatz zu unseren Versuchen lediglich 100 g XAD4 perfundiert wurden (Blutfluß 105 ml/min.). Dies ist zu erklären aus der Tatsache, daß die Arbeitsgruppe Clearanceberechnungen aus dem Vollblut vornahmen. Diese Untersuchung bezieht das "periphere Kompartiment" der Erythrozyten mit ein, aus dem während der Passage durch die Kartusche Digoxin abgegeben wird und zusätzlich gebunden wird. Inwieweit die Menge der absorbierenden Substanz im Falle des Amberlite XAD4 eine Wirkung auf die Exkretionsleistung der Kartusche hat, ist ungeklärt.

Die Flußgeschwindigkeit im extrakorporalen Kreislauf geht direkt in die Formel für die Clearanceberechnung ein und wirkt sich dadurch entscheidend auf die Effektivität der Behandlungsmethode aus. Wir haben bewußt die Flußgeschwindigkeiten 100 und 150 ml/min. gewählt, da sie häufig in der klinischen Praxis verwendet werden. Die Flußgeschwindigkeit kann wegen des stark ansteigenden Widerstandes innerhalb der Kartusche nicht beliebig erhöht werden. Unsere Versuche konnten zeigen, daß eine Senkung der Blutflußgeschwindigkeit um 1/3 lediglich eine Verkleinerung der Clearance um 1/4 bewirkt. Gleichzeitig war jedoch der Abfall der Clearance während der 3-stündigen Behandlung deutlich geringer.

Bedeuten diese Ergebnisse, daß diese Behandlungsmethode für die Therapie der Digoxin-Intoxikation zu empfehlen ist? Die Hämoperfusion und die Hämodialyse werden in entsprechend ausgestatteten Zentren heute routinemäßig

durchgeführt. Dies sollte jedoch nicht darüber hinwegtäuschen, daß die Patienten durch die Anlage des extrakorporalen Kreislaufes wie auch durch den Eingriff in Wasser- und Elektrolythaushalt und die Blutgerinnung erheblich tangiert und gefährdet werden. Unserer Meinung nach ist die Hämoperfusion deshalb nur indiziert, wenn die dadurch eliminierten Digitalismengen so groß sind, daß erwartet werden kann, eine schwere Intoxikation wesentlich zu bessern. Dazu haben wir aufgrund unserer Ergebnisse vergleichend die Digoxinmengen berechnet, die theoretisch von der gesunden Niere pro Stunde und pro Tag sowie während einer Hämodialyse und während einer Hämoperfusionsbehandlung eliminiert werden können. Angenommen werden einmal eine konstante Digoxinserumkonzentration von 2 ng/ml als die einer leichten Digoxin-Intoxikation und 10 ng/ml als die einer mittelschweren Digoxin-Intoxikation (Tab. 20). Es ist zwar möglich, mit der Hämoperfusion von Amberlite XAD4 die Eliminationsleistung der gesunden Niere während der 3-stündigen Behandlungsdauer fast zu verdoppeln, die absolut eliminierten Mengen sind jedoch nur einige /ug. Während die gesunde Niere ca. 20% des Körperbestandes von Digoxin in 24 Stunden ausscheiden kann, ist mit der Hämoperfusion des Adsorberharzes Amberlite XAD4 während der üblichen Behandlungsdauer von 3 Stunden zusätzlich lediglich 2,5% des Körperbestandes zu eliminieren. Entsprechend geringer ist die Eliminationsleistung der übrigen Methoden. Grund für diese geringe Wirksamkeit ist, daß sich nur ein geringer Teil des im Organismus vorhandenen Digoxins im Blut befindet, im zentralen Kompartiment,das mit dieser Behandlungsmethode zu erreichen ist. Auch eine weiter gesteigerte Effektivität der Elimination des Digoxins aus dem Serum, die letztlich nur durch die erreichbare Blutflußgeschwindigkeit im extrakorporalen Kreislauf limitiert wäre, könnte nur Bruchteile des Gesamtkörperglykosidbestandes eliminieren.

Digoxinelimination

Serumkonzentration	2 ng/ml	10 ng/ml
H.P. Kohle (3h)	14 µg	70 µg
H.P. XAD 4 (3h)	39 µg	196 µg
Hämofiltration (4h, 15l)	29 µg	144 µg
Hämodialyse (6h)	22 µg	108 µg
gesunde Niere (1h)	13 µg	65 µg
(24h)	312 µg	1560 µg

Tab. 17: Die Eliminationsleistung der Hämoperfusion, Hämofiltration, Hämodialyse und der gesunden Nieren bei einer angenommenen schweren und einer leichten Digoxin-Intoxikation. Es wurde jeweils eine konstante Serumkonzentration des Digoxin von 2 ng/ml und 10 ng/ml angenommen.
(Risler et al. 1979)

8. Zusammenfassung.

Die vorliegende Untersuchung bestehend aus Versuchen an Hunden und Befunden beim Menschen stellt einen Beitrag zum renalen Eliminationsmechanismus von Digoxin und seinen acetylierten und methylierten Derivaten dar. Darüber hinaus wurden Untersuchungen zur extrakorporalen Elimination durchgeführt.

Als methodische Voraussetzung zur Messung der renalen Ausscheidung von Digoxin und seinen methylierten und acetylierten Derivaten wurde ein Radioimmunoassay entsprechend der Methode von Smith et al. 1969 zur Analyse der Digoxinkonzentration im Serum und Urin erstellt. Nach Kopplung von Digoxin am Rinderserumalbumin wurden Kaninchen mit dieser Albuminhaptenverbindung immunisiert. Das Serum eines Kaninchens war am Ende der Immunisierungsperiode in einer Verdünnung von 1 : 22.000 in der Lage, Digoxin spezifisch zu binden. Während Digoxin und seine kardioaktiven Metaboliten in ähnlicher Weise vom Antikörper gebunden wurden, hatte dieser eine um den Faktor 25 geringere Affinität zum Digitoxin. Andere Steroidmoleküle insbesondere die Steroidhormone wurden in physiologischen Konzentrationen nicht vom Antikörper gebunden. Die untere Nachweisgrenze des Assays wurde mit 0,2 ng/ml bestimmt. Als Qualitätskontrolle wurden zwei Poolseren in jedem Assay-Ansatz mitgemessen, deren eingewogene Digoxinkonzentrationen 1,0 und 2,4 ng/ml betrugen. Testansätze, bei denen die radioimmunologisch gemessene Digoxinkonzentration der Poolseren um mehr als eine Standardabweichung von der effektiven Konzentration abwichen, wurden verworfen.

Die Methodik zur Messung der renalen Elimination und besonders des zugrundeliegenden Exkretionsmechanismus ist in der Literatur durchaus unterschiedlich. Wegen der daraus resultierenden verschiedenen, teils widersprüchlichen Ergebnisse, haben wir den Einfluß der Methodik auf die Messung der renalen Digoxin-Clearance

untersucht. Nach akuter und chronischer Digitalisierung mit unspezifisch und spezifisch 12 α -^{3}H-markiertem Digoxin wurden die renalen Digoxin-Clearances mit den gleichzeitig bestimmten Inulin-Clearances verglichen.

Das Verhältnis von Digoxin- zu Inulin-Clearance als Ausdruck für den renalen Exkretionsmechanismus wurde nach akuter Gabe des Glykosides mit 0,68 (unspezifisch markiertes Digoxin) und 0,72 (spezifisch 12 α ^{3}H-markiertes Digoxin) nicht signifikant verschieden gemessen.

Nach chronischer Digitalisierung mit 12 α -^{3}H-Digoxin demgegenüber wurde ein Verhältnis von Digoxin- zu Inulin-Clearance von 0,82 gefunden. Errechnet man zusätzlich die Clearances aus der radioimmunologisch gemessenen Digoxinkonzentration im Serum und Urin dieser Versuchsgruppe, so war das Verhältnis von Inulin- zu Digoxin-Clearance mit 0,79 nicht signifikant verschieden. Im Gegensatz dazu signifikant niedriger wurde nach chronischer Digitalisierung mit unspezifisch ^{3}H-markiertem Digoxin das Verhältnis von Digoxin- zu Inulin-Clearance mit 0,51 gemessen.

Zusätzliche in vitro-Versuche (Antikörperbindung, Wiederfindungsrate der Radioaktivität nach Evaporation von Serum, Urin und Stammlösung) ließen erkennen, daß das Tritium am unspezifisch markierten Digoxin nicht stabil war. Für die Messung der Digoxin-Clearance erscheint unspezifisch markiertes ^{3}H-Digoxin nicht geeignet. Aus diesem Grunde sind entsprechende Untersuchungen nur mit Vorbehalt zu werten.

Bei jeweils 19 Patienten, die eine Dauertherapie mit 0,4 ß-Acetyldigoxin bzw. 0,2 mg ß-Methyldigoxin per oral erhielten, wurden die renalen Clearances von Digoxin (die Acetylgruppe wird bereits in der Darmwand vom ß-Acetyldigoxin abgespalten, so daß im Serum und Urin Digoxin gefunden werden) bzw. ß-Methyldigoxin

(die Methylgruppe wird erst nach mehreren Leberpassagen abgespalten, so daß sowohl im Serum wie im Urin Digoxin und ß-Methyldigoxin vorhanden sind) gemessen und mit der gleichzeitig bestimmten Inulin-Clearance verglichen. Während das Verhältnis von Digoxin- zu Inulin-Clearance mit 1,15 errechnet wurde, war das Verhältnis von ß-Methyldigoxin zu Inulin-Clearance mit 0,87 signifikant niedriger. Während Digoxin einer überwiegenden glomerulären Filtration unterliegt und zusätzlich tubulär sezerniert wird, ist aufgrund unserer Untersuchungen anzunehmen, daß das wesentlich lipophilere ß-Methyldigoxin zusätzlich tubulär reabsorbiert wird.

Bei 10 Hunden wurde der renale Exkretionsmechanismus von Digoxin untersucht. Das Verhältnis von gleichzeitig gemessener Digoxin- und Inulin-Clearance wurde im Mittel mit 0,82 errechnet. Die glomeruläre Filtration des Digoxins ist beim Hund der entscheidende Exkretionsmechanismus. Eine tubuläre Reabsorption und Sekretion dürften keine wesentliche Rolle spielen.

Die renale Ausscheidung des Digoxins beim akuten Nierenversagen ist bisher nicht untersucht. Wir haben deshalb in einem Modellversuch einer prärenalen Einschränkung der Nierenfunktion den renalen Exkretionsmechanismus bei akut und chronisch digitalisierten Hunden untersucht. Wir verglichen dabei das Verhältnis der gleichzeitig gemessenen Digoxin- und Inulin-Clearance vor und nach Reduktion des renal-arteriellen Druckes um 33%, einem Eingriff, der das Glomerulusfiltrat um 68% und den Urinfluß um 85% verminderte. Während das Verhältnis von Digoxin- zu Inulin-Clearance nach akuter Digitalisierung mit 0,72 vor und 0,71 nach Reduzierung des renal-arteriellen Druckes nahezu unverändert gemessen wurde, sank es nach chronischer Digitalisierung signifikant von 0,82 auf 0,76 ab.

Obwohl diese Ergebnisse die große Bedeutung der glomerulären Filtration für die renale Digoxin-Exkretion auch nach erheblicher Einschränkung des Glomerulusfiltrates

unterstreichen, ist doch zu registrieren, daß nach chronischer Digoxingabe und einer 33%igen Abnahme des renal-arteriellen Perfusionsdruckes das Verhältnis von Digoxin- zu Inulin-Clearance signifikant von 0,82 auf 0,76 abfiel. Dies könnte für eine zusätzlich tubuläre Reabsorption des Digoxin unter diesen Verhältnissen sprechen, die aber in dieser Größenordnung ohne praktische Bedeutung sein dürfte.

Wenn sich diese Versuchsanordnung auch nur schwer auf die klinischen Verhältnisse übertragen läßt, so wird doch gezeigt, daß der renale Exkretionsmechanismus über einen großen Bereich glomerulärer Filtrationsraten konstant bleibt.

Bei 11 gesunden Probanden wurde die Interaktion von Chinidin und Digoxin beim Menschen untersucht. Nach einer 3-tägigen Aufsättigung mit 0,6 mg Digoxin täglich erhielten die Probanden während der gesamten Versuchsdauer 0,375 mg Digoxin per oral. Die Digoxinserumkonzentration und die renalen Digoxin-Clearances wurden vor und unter einer gleichzeitigen Chinidinmedikation von 500 bzw. 1000 mg Chinidinbisulfat pro Tag gemessen. Während sich die Digoxinserumkonzentration im Mittel nach einwöchiger Einnahme von 500 mg Chinidin pro Tag signifikant von 0,75 auf 1,3 ng/ml erhöhte, stieg sie nach einer weiteren Woche unter Einnahme von 1000 mg Chinidin signifikant weiter auf 1,8 ng/ml an. Gleichzeitig sank die renale Digoxin-Clearance von 186 ml/min./1,73 m^2 vor auf 125 ml/min./1,73 m^2 nach Einnahme von 500 mg Chinidin ab. Eine Erhöhung der Chinidindosis führte nicht zu einer weiteren Einschränkung der renalen Digoxin-Clearance. Das Verhältnis von Digoxin- zur gleichzeitig gemessenen Kreatinin-Clearance, die sich während des gesamten Versuchsablaufes nicht signifikant änderte, fiel von 1,25 vor auf 0,90 nach Chinidingabe ab.

Die Ergebnisse zeigen, daß der Anstieg der Serum-Digoxinkonzentration bei gleichzeitiger Chinidingabe zu einem wesentlichen Teil auf eine Einschränkung der renalen Digoxin-Clearance zurückzuführen ist. Der signifikante Abfall des Verhältnisses von Digoxin- zur Kreatinin-Clearance spricht für eine Abnahme der tubulären Sekretion des Digoxins unter gleichzeitiger Chinidingabe.

Die extrakorporale Digoxin-Eliminationwird in zweierlei Hinsicht diskutiert:

Ist sie eine probate Methode zur Behandlung der schweren Digoxin-Intoxikation?
Muß bei Patienten, die sich wegen einer terminalen Niereninsuffizienz einer Dialyse oder Hämofiltrationsbehandlung unterziehen müssen, die Dosierung den extrakorporalen Digoxinverlusten angepaßt werden?

Wir haben dazu bei jeweils 5 Patienten die Clearance von Digoxin für zwei Plattendialysatoren (Membranoberfläche 1 m^2 und 1,5 m^2) sowie einen Kapillardialysator (Membranoberfläche 1 m^2) untersucht. Es wurden Clearancewerte zwischen 17 ml/min. und 32 ml/min. ermittelt. Die Digoxin-Clearances, die bei der Hämofiltration von 5 Patienten ermittelt wurden, waren deutlich größer mit 60 ml/min. Ebenso hohe Clearancewerte wie die menschlicher Nieren (Digoxin-Clearance: 109 ml/min.) waren mittels Hämoperfusion über Amberlite XAD4 zu erreichen. Während der 3-stündigen Behandlung wurde eine mittlere Digoxin-Clearance von 112 ml/min. errechnet.

Sieht man allerdings von den Clearancewerten ab und errechnet die effektiv eliminierten Digoxinmengen während einer Behandlung, so ist selbst mit der wirkungsvollsten Methode weniger als 3% des Körperbestandes zu eliminieren. Da sich nur ein sehr geringer Anteil des Körperdigoxinbestandes im Blut befindet, ist die Elimination aus diesem Kompartiment nur sehr wenig effektiv. Daraus folgt unserer

Meinung nach, daß eine extrakorporale Digoxin-Elimination nicht zur Intoxikationsbehandlung geeignet ist und daß eine Dosisangleichung bei Patienten, die dialysiert werden, nicht notwendig ist.

9. Literatur:

1) Ackerman, G.L., J.E.Doherty, W.J.Flanigan:
Peritoneal dialysis and hemodialysis of tritiated digoxin
Ann.Intern.Med. 67, 718 (1967)

2) Alexander, F., H.Gold, L.N.Katz, R.L.Levy, R.Scott, P.D.White:
The relative value synthetic quinidine, dihydroquinidine, commercial quinidine, and quinidine in the control of arrhythmias
J.Pharmacol.Exp.Ther. 90, 191 (1947)

3) Augsberger, A.:
Quantitatives zur Therapie mit Herzglykosiden. I.Mitteilung. Die Variabilität von Glykosidbedarf und -toleranz
Med. Welt 3 N.F. 1471 (1951)

4) Augsberger, A.:
Quantitatives zur Therapie mit Herzglykosiden. II.Mitteilung. Kumulation und Abklingen der Wirkung
Klin.Wschr. 32, 945 (1954)

5) Baczynski, R., F.Kokot:
Der Einfluß von Furosemid auf die ß-Methyldigoxin-Ausscheidung im Urin
Dtsch.Med.Wschr. 103, 662 (1978)

6) Baggot, J.D., L.E.Davis:
Plasma protein binding of digitoxin and Digoxin in several mammalian species
Res.Vet.Sci. 15, 81 (1973)

7) Beller, G.A., T.W.Smith, W.H.Abelmann, E.Haber, W.B.Hood:
Digitalis intoxication. A prospective clinical study with serum level correlations
N.Engl.J.Med. 284, 989 (1971)

8) Benthe, H.F.:
Die Elimination von Digoxin und seinen Acetylderivaten
In: R.Schröder, K.Greeff: Aktuelle Digitalisprobleme. Urban u.Schwarzenberg, München 1972.

9) Benthe, H.F.:
Organverteilung verschiedener Herzglykoside
In: H.Jahrmärker: Digitalistherapie, Springer, Berlin 1975

10) Bertler, A., A.Redfors:
An improved method of estimating digoxin in human plasma
Clin.Pharmacol.Ther. 11, 665 (1970)

11) Binnion, P.F., L.M.Morgan, H.M.Stevenson, E.Fletcher:
Plasma and myocardial digoxin concentrations in patients on oral therapy
Br.Heart J. 31, 636 (1969)

12) Bismuth, C., G.Mottê, J.P.Fréjaville, F.Conso:
L'hyperkaliémie dans l'intoxication digitalique massive. Valeur pronostique et implications thérapeutique
Arch.Mal.Coer 66, 1537 (1973)

13) Bissett, J.K., J.E.Doherty, W.J.Flanigan, G.V.Dalrymple:
Tritiated digoxin. XIX.Turnover studies in diabetes insipidus
Am.J.Cardiol. 31, 327 (1973)

14) Bloom, P.M., W.B.Nelp, S.H.Tuell:
Relationship of the excretion of tritiated digoxin to renal function
Am.J.Med.Sci. 251, 133 (1966)

15) Bonelli, J., H.Haydl, K.Hruby, G.Kaik:
The pharmacokinetics of digoxin in patients with manifest hyperthyroidism and after normalization of thyroid function
Int.J.Pharmacol.Biopharm.16, 302 (1978)

16) Brass, H., H.Philips:
Die Elimination von α -Acetyldigoxin und K-Strophanthin bei Niereninsuffizienz
Klin.Wschr. 48, 972 (1970)

17) Brass, H.: Die Pharmakokinetik von ^{3}H- α -Acetyldigoxin und ^{3}H-K-Strophanthin bei terminaler Niereninsuffizienz
Verh.Dtsch.Ges.Kreislauffschg. 36, 382 (1970)

18) Bricker, N.S., P.A.F.Morrin, S.W.Kime:
The pathologic physiology of chronic Bright's disease
Am.J.Med. 28, 77 (1960)

19) Brooker, G., R.W.Jelliffe:
Serum cardiac glycoside assay based upon displacement of ^{3}H-Quabain from Na-K-ATPase
Circulation 45, 20 (1972)

20) Brown, D.D., J.C.Dormois, G.N.Abraham, K.Lewis, K.Dixon:
Effect of furosemide on the renal excretion of digoxin
Clin.Pharmacol.Ther. 20, 395 (1976)

21) Buchborn, E., H.Edel:
Akutes Nierenversagen
In: H.Schwiegk: Handbuch der Inneren Medizin, Bd.VIII, Springer, Berlin 1968

22) Buckesfeld, R.P., H.D.Bolte:
Glykosidtoleranz und Glykosidkonzentration im Serum. Klinische Untersuchungen bei herzkranken Patienten unter Digoxintherapie
Verh.Dtsch.Ges.Kreislauffschg. 40, 315 (1974)

23) Burger, A., D.Dinichert, P.Nicod, M.Jenny, T.Lematchaud-Béraud, M.B.Vallotton:
Effect of amidarone on serum triiodothyronine, reverse triiodothyronine, thyroxin and thyrotropin
J.Clin.Invest. 58, 255 (1976)

24) Burnett, G.H., R.L.Conklin:
The enzymatic assay of plasma digitoxinlevels
J.Lab.Clin.Med. 71, 1040 (1968)

25) Butler, V.P.jr., J.P.Chen:
Digoxin-specific antibodies
Proc.Nat.Acat.Sci. USA 57, 71 (1967)

26) Carvallo, A., B.Ramirez, H.Honig, J.Knepshield, G.E.Schreiner, M.C.Gelfand:
Treatment of digitalis intoxication by charcoal hemoperfusion
Trans.Am.Soc.Art.Intern.Organs 22, 718 (1976)

27) Chung, E.K.: Digitalis-Intoxikation
Excerpta Med.Foundation 18 (1969)

28) Clark, D.R., S.M.Kalman:
Dihydrodigoxin: A common metabolite of digoxin in man
Drug Metabolism Disposition 2, 203 (1974)

29) Cohen, J.S., H.Jick, S.J.Cohen:
Adverse reactions to quinidine in hospitalized patients. Findings based on data from the Boston Collaborative Drug Surveillance Program
Progr.Cardiovasc.Dis. 20, 151 (1977)

30) Cramer, G., B.Isaksson:
Quantitative determination of quinidine in plasma
Scand.J.Lab.Invest. 15, 553 (1963)

31) Croxson, M.S., H.K.Ibbertson:
Serum digoxin in patients with thyroid disease
Br.Med.J. 3, 566 (1976)

32) Davis, D., H.B.Sprague:
Ventricular fibrillation. Its relation to heartblock
Am.Heart J. 4, 559 (1929)

33) Dengler, H.J., G.Bodem, K.Wirth:
Pharmakokinetische Untersuchungen mit ^{3}H-Digoxin und ^{3}H-Lanatosid beim Menschen
Arzneim.Forsch. 23, 64 (1973)

34) Dettli, L.: Arzneimittel-Elimination bei Niereninsuffizient
Praxis 62, 476 (1973)

35) Deutsch, E.:
Mitteilungen zur Nierenclearance.
I. Eine einfache Methode zur quantitativen Bestimmung der Lävulose und des Inulin in Harn und Blut
Klin.Med. 4, 81 (1949)

36) Dieckmann, L., K.Michelis, B.Brisse:
Behandlung der akzidentiellen Digitalisvergiftung beim Kleinkind mit Hämodialyse
Mschr.Kinderheilk. 124, 82 (1976)

37) Dobbs, S.M., G.E.Mawer, M.Rodgers, B.G.Woodcock, S.B.Lucas:
Can digoxin dose requirements be predicted
Br.J.Clin.Pharmacol. 3, 231 (1976)

38) Documenta Geigy
Wissenschaftliche Tabellen
Basel 1968

39) Doering, W., E.König:
Anstieg der Digoxinkonzentration im Serum unter Chinidinmedikation
Med.Klin. 73, 1085 (1978)

40) Doering, W.:
Quinidine-Digoxin-Interaction
N.Engl.J.Med. 30, 400 (1979)

41) Doherty, J.E., W.J.Flanigan, M.L.Murphy, R.T.Bulloch, G.L.Dalrymple, O.W.Beard, W.H.Perkins:
Tritiated digoxin. XIV. Enterohepatic circulation, absorption and excretion studies in human volunteers
Circulation 42, 867 (1970)

42) Doherty, J.E., W.H.Hall:
Tritiated digoxin. XV. Serum protein binding in human subjects
Am.J.Cardiol. 28, 326 (1971)

43) Doherty, J.E., W.H.Perkins:
Studies with tritiated digoxin in human subjects after intravenous administration
Am.Heart J. 63, 528 (1962)

44) Doherty, J.E., J.J.Kane:
Clinical pharmacology and therapeutics use of digitalis glykosides
Drugs 6, 182 (1973)

45) Doherty, J.E., W.H.Perkins, G.K.Mitchell:
Tritiated digoxin studies in human subjects
Arch.Intern.Med. 108, 531 (531)

46) Doherty, J.E., W.H.Perkins:
Digoxinmetabolism in hypo- and hyperthyroidism
Ann.Int.Med. 64, 489 (1966)

47) Doherty, J.E., C.B.Ferrell, E.J.Towbin:
Localization of the renal excretion of the tritiated digoxin
Am.J.Med.Sci. 258, 181 (1969)

48) Doherty, J.E., W.H.Perkins, M.C.Wilson:
Studies with tritiated digoxin in renal failure
Am.J.Med. 37, 536 (1964)

49) Doherty, J.E., W.J.Flanigan, G.V.Dalrymple:
Tritiated digoxin. XVII. Excretion and turnover times in normal donors before and after nephrectomy and in the paired recipient of the kidney after transplantation
Am.J.Cardiol. 29, 470 (1972)

50) Ejvinsson, G.:
Effect of quinidine on plasma concentrations of digoxin
Br.Med.J. 1, 279 (1978)

51) Erlanger, B.F., S.M.Beiser:
Antibodies specific for ribonucleosides and rebonucleotides and their reaction with DNA
Proc.Acad.Sci. USA 52, 68 (1964)

52) Evered, D.C.:
The binding of digoxin by the serum proteins
Eur.J.Pharmacol. 18, 236 (1972)

53) Ewy, G.A., G.G.Kapadia, L.Yao, M.Lullin, F.I.Marcus:
Digoxin metabolism in the elderly
Circulation 39, 449 (1969)

54) Falch, D.: The influence of kidney function, body size and age on plasma concentration and urinary excretion of digoxin
Acta Med.Scand. 194, 251 (1973)

55) Falch, D., A.Teien:
The influence of kidneyfunction on the plasma level and urinary excretion of digoxin
In: O.Storstein: Symposium on Digitalis, Gyldendahl Norsk Forlag Oslo 1973

56) Flasch, H., V.Schumpelic, G.Koch:
Resorptionsverhalten von oral appliziertem ß-Acetyldigoxin beim Menschen
Arzneim.Forsch. 27, 656 (1977)

57) Focke, Die Weiterentwicklung der physiologischen Digitalisprüfung
Z.Exp.Path. 14, 262 (1913)

58) Gault, M.H., J.R.Jeffrey, E.Chirito, L.L.Ward:
Studies of digoxin dosage, kinetics and serum concentrations in renal failure and review of the literature
Nephron. 17, 161 (1976)

59) Gibson, T.P., S.V.Lucas, H.A.Nelson, A.J.Atkinson, G.T.Okita, P.Ivanovich:
Hemoperfusion removal of digoxin from dogs
J.Lab.Clin.Med. 91, 673 (1978)

60) Gilfrich, H.J., P.Schölmerich:
Digitalis-Intoxikation. Neuere Gesichtspunkte zur Entstehung und Bewertung
Dtsch.Med.Wschr. 100, 831 (1975)

61) Gold, H., W.Modell, L.Price:
Combined actions of quinidine and digitalis on the heart
Arch.Intern.Med. 50, 766 (1932)

62) Gottlieb, R.:
Über die Methodik der Wertbestimmung von Digitalispräparaten am Frosch
Münch.Med.Wschr. 61, 813 (1914)

63) Greenblatt, D.J., D.W.Duhme, J.Koch-Weser, T.W.Smith:
Evaluation of digoxin bioavailability in single-dose studies
N.Engl.J.Med. 289, 651 (1973)

64) Greenwood, H., W.Snedden, R.P.Hayward, J.Landon:
The measurement of urinary digoxin and dihydrodigoxin by radioimmunoassay and by mass spectroscopy
Clin.chim.Acta 62, 213 (1975)

65) Grosse-Brockhoff, F., K.J.Hengels, W.-P.Fritsch, B.Grabensee, T.U.Hausamen:
Serum-Digoxinspiegel und Nierenfunktion
Dtsch.Med.Wschr. 98, 1547 (1973)

66) Haasis, R., D.Larbig, R.Buckesfeld, D.Jeschke, K.Paschen, K.Schick:
Die Digitalis-Intoxikation in suizidaler Absicht
Intensivmed. 12, 210 (1975)

67) Haasis, R., D.Larbig:
Serum-Glykosidkonzentration und Digitalis-Intoxikation
Dtsch.Med.Wschr. 100, 1768 (1975)

68) Hager, W.D., P.Fenster, M.Mayersohn, D.Perrier, P.Graves, F.J.Marcus:
Digoxin-quinidine interaction: Pharmacokinetic evaluation
N.Engl.J.Med. 300, 1238 (1979)

69) Walkin, H., L.B.Sheiner, C.C.Peck, K.L.Melmon:
Determinants of the renal clearance of digoxin
Clin.Pharmacol.Ther. 17, 385 (1975)

70) Hatcher, R.A., R.Brody:
The biological standardization of drugs
Am.J.Pharmacy 82, 360 (1910)

71) Holt, D.W., T.A.Traill, C.B.Brown:
The treatment of digoxin overdosage
Clin.Neph. 3, 119 (1975)

72) Hooymans, P.M., F.W.H.M.Merkus:
Effect of quinidine on plasma concentration of digoxin
Br.Med.J. 1022 (1978)

73) Huffman, D.H., D.L.Azarnoff:
Absorption of orally given digoxin preparations
JAMA 222, 957 (1972)

74) Huffman, D.H., J.W.Crow, P.Pentikainen, D.Azarnoff:
Association between clinical cardiac status, laboratory perameters and digoxin usage
Am.Heart J. 91, 28 (1976)

75) Iisalo, E., I.Ruikka:
Serum levels and renal excretion of digoxin in the elderly, a comparison between three different preparations
Acta Med.Scand. 196, 59 (1974)

76) Iisalo, E., J.Forsstroem:
Elimination of digoxin during maintenance haemodialysis
Ann.Clin.Res. 6, 203 (1974)

77) Jelliffe, R.W., G.Brooker:
A nomogram for digoxin therapy
Am.J.Med. 57, 63 (1974)

78) Jelliffe, R.W., J.Buell, R.Kalaba:
Reducation of digitalis toxicity by computer-assisted glycoside dosage regimens
Ann.Intern.Med. 77, 891 (1972)

79) Jelliffe, R.W.:
An improved method of digoxin therapy
Ann.Intern.Med.Vol. 69, 703 (1968)

80) Jelliffe, R.W., D.H.Blankenhorn:
Gaschromatography of digitoxigenin and digoxigenin
J.Chromatogr. 12, 268 (1963)

81) Joachimoglou,
Weitere Erfahrungen über Digitalis
Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Exp.Path.
Pharmacol. 91, Nr. 3 (1921)

82) Johnson, B.F., C.Bye:
Maximal intestinal absorption of digoxin, and its relation of steady state plasma concentration
Br.Heart J. 37, 203 (1975)

83) Johnson, B.F., C.E.Bye, G.E.Jones, G.A.Sabey:
The pharmacokinetics of beta-methyl digoxin compared with digoxin tablets and capsules
Eur.J.Clin.Pharmacol. 10, 231 (1976)

84) Jusko, W.J., M.Weintraub:
Myocardial distribution of digoxin and renal function
Clin.Pharmacol.Ther. 16, 449 (1974)

85) Kaufmann, G.:
Is there a need for new glycosides?
For more blood level determinations
In: G.Bodem, H.J.Dengler: Cardiac glycosides, Springer Berlin 1978

86) Kawada, T.:
Open heart surgery and plasma digoxin-concentration
J.Jap.Assoc.Thoracic.Surg. 24, 113 (1976)

87) Kessler, K.M., D.T.Löwenthal, H.Warner, T.H.Gibson, W.Briggs, M.M.Reidenberg:
Quinidine elimination in patients with congestive heart failure or poor renal function
N.Engl.J.Med. 290, 706 (1974)

88) Kobayashi, Y., D.V.Maudsley:
Biological applications of liquid scintillation counting
Academic Press, New York 1974

89) Köhler, E., K.Greeff:
Der Einfluß des Blut-pH auf die Toxicität herzwirksamer Glykoside
Res.exp.Med. 159, 65 (1972)

90) Koup, J.R., D.J.Greenblatt, W.J.Jusko, T.W.Smith, J.Koch-Weser:
Pharmacokinetics of digoxin in normal subjects after intravenous bolus and infusion doses
J.Pharmac.Biopharm. 3, 181 (1975)

91) Koup, J.R., W.J.Jusko, C.M.Elwood, R.K.Kohli:
Digoxin pharmacokinetics: Role of renal failure in dosage regimen design
Clin.Pharmacol.Ther. 18, 9 (1975)

92) Kramer, P.: Digitalis pharmacokinetics and therapy with respect to impaired renal function
Klin.Wschr. 55, 1 (1977)

93) Kramer, P., J.Horenkamp, B.Willms, F.Scheler:
Das Kumulationsverhalten verschiedener Herzglykoside bei Anurie
Dtsch.Med.Wschr. 95, 444 (1970

94) Kramer, P., E.Ströh, D.Matthei, F.Teiwes, F.Scheler:
Increased digitalis tolerance in uremic patients
In: Bodem, G., H.J.Dengler: Cardiac glycosides, Springer, Berlin 1978

95) Kramer, P., E.Quellhorst, J.Horenkamp, F.Scheler:
Dialysance und prozentuale Elimination verschiedener Herzglykoside während der Hämo- und Peritonealdialyse
Klin.Wschr. 50, 609 (1972)

96) Kramer, P., Koethe, E., F.Scheler:
Uraemic and normal plasma protein binding of various cardiac glycosides under "in vivo" Conditions
Eur.J.Clin.Invest. 4, 53 (1974)

97) Kuschinsky, K.:
Über die Bindungseigenschaften von Plasmaproteinen für Herzglykoside
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.Exp. Path. 262, 388 (1969)

98) Larbig, D., R.Haasis:
Untersuchungen zur Elimination von Digoxin und ß-Methyldigoxin
Verh.Dtsch.Ges.In.Med. 82, 1717 (1976)

99) Larbig, D., R.Haasis, H.D.Bundschu, R.G.Buckesfeld, P.G.Lankisch, R.Ilg, J.Girndt:
Radioimmunchemische Bestimmung von Digoxin und Digoxinderivaten im Serum und Urin bei normaler und eingeschränkter Nierenfunktion
Verh.Dtsch.Ges.Inn.Med. 80, 1077 (1974)

100) Leahey, E.B., J.A.Reiffel, R.E.Drusin, R.H.Heissenbuttel, W.P.Lovejoy, J.T.Bigger:
Interaction between quinidine and digoxin
JAMA 240, 533 (1978)

101) Lowenstein, J.M.:
A method for measuring plasma levels of digitalis glycosides
Circulation 31, 228 (1965)

102) Lowry, O.H., N.J.Rosenbrough, A.L.Farr, R.J.Randall:
Protein measurement with the folin phenol reagent
J.Biol.Chem. 193, 265 (1951)

103) Luchi, R.J., J.W.Gruber:
Unusually large digitalis requirements
Am.J.Med. 45, 322 (1968)

104) Lukas, D.S.:
Same aspects of the distribution and disposition of digitoxin in man
Ann.N.Y.Acad.Sci. 179, 338 (1971)

105) Lukas, D.S., A.G. de Martino:
Binding of digitoxin and some related cardenolides to human plasma proteins
J.Clin.Invest. 48, 1041 (1969)

106) Malcolm, A.D., F.Y.Leung, J.C.Fuchs, J.E.Duarte:
Digoxin kinetics during furosemide administration
Clin.Pharmacol.Ther. 21, 567 (1977)

107) Marcus, F.I., J.Pavlovich, L.Burkhalter, C.Cuccia:
The metabolic fate of tritiated digoxin in the dog: a comparison of digitalis administration with and without a loading dose
J.Pharmacol.Exp.Ther. 156, 548 (1967)

108) Marcus, F.I., A.S.Peterson, A.F.Salel, J.Scully, G.G.Kapadia:
Metabolism of tritiated digoxin in renal insufficiency in dogs and man
J.Pharmacol.Exp.Ther. 152, 372 (1966)

109) Marcus, F.I., G.J.Kapadia, G.G.Kapadia:
The metabolism of digoxin in normal subjects
J.Pharmacol.Exp.Ther. 145, 203 (1964)

110) McAllister, R.G., S.M.Howell, M.S.Gomer, J.B.Selby:
Effect of intravenous furosemide on the renal excretion of digoxin
J.Clin.Pharmacol. 110 (1976)

111) McEvoy, A.F., W.G.Harris:
Evaluation of liquid scintillation systems for the assay of tritiated inulin
Anal.Biochem. 43, 123 (1971)

112) Medzihradsky, F., P.S.Nandhasri, U.Khanna:
Enzymatic determination of cardiac glycosides
Biochem.Med. 5, 285 (1971)

113) Ochs, H., G.Bodem, G.Kodrat, B.Savic, M.P.Baur:
Biologische Verfügbarkeit von Digoxin bei Patienten mit und ohne Magenresektion nach Billroth II, vergleichende Untersuchungen
Dtsch.Med.Wschr. 100, 2430 (1975)

114) Ohnhaus, E.E., P.Spring, L.Dettli:
Eliminationskinetik und Dosierung von Digoxin bei Patienten mit Niereninsuffizienz
Dtsch.Med.Wschr. 99, 1797 (1974)

115) Ohnhaus, E.F., P.Spring, L.Dettli:
Protein binding of digoxin in human serum
Eur.J.Clin.Pharmacol. 5, 34 (1972)

116) Pall, H., J.Bonelli, G.Finkensted, G.Hitzelberger, A.Korn, R.Kotzaurek, M.Pichler, G.Raberger, S.Szaless:
Digitaliskinetik unter forcierter Diurese
Intensivmedizin 11, 322 (1974)

117) Palmer, K.H., B.Martin, B.Baggett, E.Wall:
The metabolic fate of orally administered quinidine gluconate in humans
Biochem.Pharmacol. 18, 1845 (1969)

118) Paulson, M.F., P.G.Welling:
Calculation of serum digoxin levels in patients with normal and impaired renal function
J.Clin.Pharmacol. 16, 660 (1976)

119) Peters, U., L.C.Falk, S.M.Kalman:
Digoxin metabolism in patients
Arch.Intern.Med. 138, 1074 (1978)

120) Prichard, S., E.Chirito, T.Chang, A.D.Sniderman:
Microencapsulated charcoal hemoperfusion:
Apossible therapeutic adjunct in digoxin toxicity
J.Dial. 1, 367 (1977)

121) Reidenberg, M.M.:
Effect of disease states on plasma protein binding of drugs
Med.Clin.North.Am. 58, 1103 (1974)

122) Reiffel, J.A., E.B.Leahey, R.E.Drusin, R.H.Heissenbuttel, W.Lovejoy:
A digoxin-quinidine interaction
Am.J.Cardiol. 41, 368 (1978)

123) Reiffel, J.A., E.B.Leahey, R.E.Drusin, R.H.Heissenbuttel, W.Lovejoy, J.T.Bigger:
A previously unrecognized drug interaction between quinidine and digoxin
Clin.Cardiol. 2, 40 (1979)

124) Reuning, R.H., R.A.Sams, R.E.Notari:
Role of pharmacokinetics in drug dosage adjustment, I.Pharmacologic effect kinetics and apparent volume of distribution of digoxin
J.Clin.Pharmacol. 13, 127 (1973)

125) Rick, W.: Klinische Chemie und Mikroskopie
Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York 1974

126) Rietbrock, N., J.Kuhlmann, H.F.Vöhringer:
Pharmakokinetik von Herzglykosiden und klinische Konsequenzen
In: K.Hierholzer, N.Rietbrock: Physiologische und pharmakologische Grundlagen der Therapie
Perimed, Erlangen 1977

127) Rietbrock, N., U.Abshagen, K.v.Bergmann, H.Rennekamp:
Disposition of ßmethyldigoxin in man
Eur.J.Clin.Pharmacol. 9, 105 (1975)

128) Risler, T., U.Peters, B.Grabensee, L.Seipel:
Untersuchung zur Interaktion von Chinidin und Digoxin beim Menschen
Dtsch.Med.Wschr. 104, 1523 (1979)

129) Risler, T., G.Arnold, B.Grabensee:
Ist die Hämoperfusion zur Behandlung der Digoxin-Intoxikation geeignet?
Z.Kardiol. 68, 313 (1979)

130) Risler, T., B.Grabensee, F.Grosse-Brockhoff:
EKG-Behandlungen und Digoxin-Serumkonzentration bei Digitalis-Intoxikationen
Dtsch.Med.Wschr. 100, 821 (1975)

131) Risler, T., B.Grabensee, T.U.Hausamen, E.Schröder, F.Grosse-Brockhoff:
Digoxin-Clearance bei Nierengesunden und bei Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion
Verh.Dtsch.Ges.Kreislauffschg. 40, 306 (1974)

132) Roman, R.J., M.L.Kauker:
Renal tubular transport of ^{3}H-Digoxin in saline diuresis in rats
Circ.Res. 38, 185 (1976)

133) Ruiz-Torres, A., H.Burmeister:
Stoffwechsel und Kinetik von ß-Acetyldigoxin
Klin.Wschr. 50, 191 (1972)

134) Ruiz-Torres, A.:
Änderung der Glykosidtoleranz durch hormonelle Faktoren
Verh.Dtsch.Ges.Inn.Med. 83, 91 (1977)

135) Rumpf, K.W., J.Rieger, B.Doht, R.Ansorg, P.Kramer:
Elimination von Pharmaka durch Hämofiltration
In: F.Scheler, H.U.Henning: Hämofiltration
Urban und Schwarzenberg, München 1978

136) Scheler, F., W.Wigger, D.Höffler, E.Quellhorst:
Steigerung der Digitalistoxizität bei eingeschränkter Nierenfunktion
Dtsch.Med.Wschr. 90, 1614 (1965)

137) Scholtan, W., K.Schlossmann, H.Rosenkranz:
Bestimmung der Eiweißbindung von Digitalispräparaten mittels der Ultrazentrifuge
Arzneim.Forsch. 16, 109 (1966)

138) Schreiner, G.E.:
Dialysis of poisons and drugs-annual review
Trans.Am.Soc.Artif.Intern Organs 16, 544 (1970)

139) Seipel, H., E.F.Hueber, E.Deutsch, U.Lutz, M.Wichtl, K.Jentzsch:
Quantitative Digoxinbestimmung im Blut routinemäßig digitalisierter Patienten
Klin.Wschr. 46,1257 (1968)

140) Sempler, P., W.J.Tilstone, D.H.Lawson:
Furosemide and urinary digoxin clearance
N.Engl.J.Med. 293, 612 (1975)

141) Shenfield, G.M., J.Thompson, D.B.Horn:
Plasma and urinary digoxin in thyroid dysfunction
Eur.J.Clin.Pharmacol. 12, 437 (1977)

142) Smith, H.W., N.Finkelstein, L.Aliminosa, B.Crawford, M.Graber:
The renal clearances of substituted hippuric acid derivatives and other aromatic acids in dog and man
J.Clin.Invest. 24, 388 (1945)

143) Smith, H.W., W.Goldring, H.Chasis:
The measurements of the tubular excretory mass, effective blood flow and filtration rate in the normal human kidney
J.Clin.Invest. 17, 263 (1938)

144) Smith, T.W.:
Digitalis toxicity: Epidemiology and clinical use of serum concentration measurements
Am.J.Med. 58, 470 (1975)

145) Smith, T.W., E.Haber:
Digoxin intoxication: The relationship of clinical presentation to serum digoxin concentration
J.Clin.Invest. 49, 2377 (1970)

146) Smith, T.W., Butler, V.P. jr., E.Haber:
Determination of therapeutic and toxic serum digoxin concentrations by radioimmunoassay
N.Engl.J.Med. 281, 1212 (1969)

147) Steiness, E.:
Suppression of renal excretion of digoxin in hypokalemic patients
Clin.Pharmacol.Ther. 23, 511 (1978)

148) Steiness, E.:
Renal tubular secretion of digoxin
Circulation 50, 103 (1974)

149) Storstein, L.:
Studies on digitalis. V. The influence of impaired renal function, Hemodialysis and drug interaction on serum protein binding of digitoxin and digoxin
Clin.Pharmacol.Ther. 20, 6 (1976)

150) Straub, K.D., J.J.Kane, J.K.Bisset:
Alteration of digitalis binding by quinidine, a mechanism of digitalis-quinidine interaction
Circulation 58, Suppl 2/3, 219 (1978)

151) Straub, W.:
Die Digitaliswirkung am isolierten Vorhof des Frosches
Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Exp.Path.Pharmacol. 79, 19 (1915)

152) Szefler, S.J., W.J.Jusko:
Decreased volume of distribution of digoxin in a patient with renal failure
Res.Commun chem.Pathol.Pharmacol. 6, 1095 (1973)

153) van Ostveen, J.J.J.:
De kwantitatieve bepaling van digoxine in biologisch materiaal.
I. Dunnelaagchromatographie
Pharm.Weekblad 111, 21 (1976)

154) van der Vijgh, W.J., P.L.Oe:
Pharmacokinetic aspects of digoxin in patients with terminal renal failure
II. on hemodialysis
Int.J.Clin.Pharmac. 15, 255 (1977)

155) van der Vijgh, W.J.F., P.L.Oe:
Pharmacokinetic aspects of digoxin in patients with terminal renal failure
I. off dialysis
Int.J.Clin.Pharmacol. 15 (249 (1977)

156) Wagner, J.G., J.D.Yates, P.W. Willis, E.Sakmar, R.G. Stoll:
Correlation of plasma levels of digoxin in cardiac patients with dose and measures of renal function
Clin.Pharmacol.Ther. 15, 291 (1974)

157) Waldorf, S., J.D.Andersen, N.Heeboll-Nielsen, O.G.Nielsen, E.Moltke, U.Sorensein, E.Steiness:
Spironolactone-induced changes in digoxin kinetics
Clin.Pharmacol.Ther. 24 , 162 (1978)

158) Wallace, S., B.Whiting:
Some clinical implications of the protein binding of digoxin
Brit.J.Clin.Pharmacol. 1, 325 (1974)

159)Watson, E., S.M.Kalman:
Assay of digoxin in plasma by gas chromatography
J.Chromatogr. 56, 209 (1971)

160) Weaver, L.C., T.Akera, T.M.Brody:
Digitalistoxicity: lack of marked effect on brain Na-K-adenosine triphosphatase in the cat
J.Pharmacol.Exp.Ther. 200, 638 (1977)

161) Weidler, D.J., N.S.Jallad, H.S.Movahhed, E.Sakmar, J.G.Wagner:
Pharmacokinetics of digoxin in the cat and comparisons with man and the dog
Res.Commun chem.Pathol.Pharmacol. 19, 57 (1978)

162) Wilson, W.E., S.A.Johnson, W.H.Perkins, J.E.Ripley:
Gaschromatographic analysis of cardiac glycosides and related compounds
Anal.Chem. 39, 40 (1967)

163) Wilzbach, K.E.:
Tritium-labeling by exposure of organic compounds to tritium gas
J.Am.Chem.Soc. 79, 1013 (1957)

164) Wirth, K., G.Bodem, H.J.Dengler:
Resorption, Ausscheidung und Stoffwechsel von Digoxin und digoxinverwandten Verbindungen
In: R.Schröder, K.Greeff: Aktuelle Digitalisprobleme, Urban und Schwarzenberg, München 1972

165) Yarlow, R.S., S.A.Berson:
Immunoassay of endogenous insulin in man
J.Clin.Invest. 39, 1157 (1960)